



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**TESTES DE DESAFIO COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS CÁRNEOS
DE AVES**

Margarida Inês Pires Traça

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques
Barreto

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá
Henriques

Dra. Maria Luísa Nunes Ferreira

ORIENTADORA

Dra. Maria Luísa Nunes Ferreira

COORDINADORA

Doutora Maria João dos Ramos
Fraqueza

2018

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**TESTES DE DESAFIO COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS CÁRNEOS
DE AVES**

Margarida Inês Pires Traça

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques
Barreto

Doutora Ana Rita Barroso Cunha de Sá
Henriques

Dra. Maria Luísa Nunes Ferreira

ORIENTADORA

Dra. Maria Luísa Nunes Ferreira

COORDINADORA

Doutora Maria João dos Ramos
Fraqueza

2018

LISBOA

Agradecimentos

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo de várias pessoas, às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento:

À Dra. Maria Luísa Ferreira, minha orientadora, que me acolheu e integrou na sua equipa e permitiu a realização deste estudo. Agradeço a disponibilidade, simpatia e franqueza em todas as etapas da realização desta dissertação. Agradeço também por ter acreditado em mim e no meu trabalho e por ter possibilitado que continuasse a trabalhar na área da Qualidade e Segurança Alimentar.

Deixo uma palavra de apreço também a toda a equipa do departamento de qualidade, sendo que foram essenciais para me despertar algum sentido crítico na realização do trabalho científico.

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, minha coorientadora, que me ajudou desde o início ao fim da realização desta dissertação, esteve sempre disponível para ouvir todas as minhas preocupações e para esclarecer todas as minhas dúvidas. Agradeço também a confiança na minha pessoa e a simpatia que sempre a caracteriza.

Não posso deixar de agradecer também às técnicas do laboratório de Tecnologia e Segurança Alimentar, Helena Fernandes e Engenheira Maria José Fernandes, que foram essenciais para a realização do trabalho experimental, sempre com simpatia e uma palavra de apoio.

À minha mãe, por ser sempre e em primeiro lugar, mãe.

Ao meu pai, pelo nosso segredo.

À minha restante família, Çalo, Rucha, Rucho, Deo, Tita, Nina e Paula pelo apoio e incentivo.

Ao Ric, por ser sempre o meu melhor amigo.

À Luna, porque sem ela eu não estaria aqui.

Aos meus amigos, porque me fazem sempre sorrir e ser mais e mais feliz.

TESTES DE DESAFIO COM *LISTERIA MONOCYTOGENES* EM PRODUTOS CÁRNEOS DE AVES

Resumo

A bactéria *Listeria monocytogenes* é um agente patogénico com bastante relevância na indústria alimentar, principalmente na produção de produtos prontos a consumir. De acordo com o Regulamento (CE) nº2073/2005 e respetivas alterações, os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir estudos de vida útil para cada produto produzido. Quando estes estudos não são conclusivos em relação à segurança do alimento, os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir estudos adicionais, entre os quais testes que investigam a suscetibilidade de determinado microrganismo, quando inoculado no alimento, multiplicar-se ou sobreviver em condições razoáveis de armazenamento (referidos como testes de desafio). O objetivo deste estudo foi desenvolver testes microbiológicos de desafio em produtos de aves cozidos e fumados, para determinar se estes produtos são passíveis de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Foi possível determinar para cada produto o potencial de crescimento da população bacteriana e a sua taxa máxima de crescimento. Estes dados permitem que sejam estabelecidos limites de concentração máxima de *Listeria monocytogenes* num determinado dia de armazenamento, de forma a não ser ultrapassado o limite regulamentar de concentração máxima de *Listeria monocytogenes* de 100 ufc/g até ao final do período de vida útil do produto, desde que, o estabelecimento destes limites de controlo internos seja aprovado pela autoridade competente. Foram escolhidos dois produtos para serem inoculados, um produto cozido (fiambre de peru) e um produto fumado (salsichão de peru com alho), ambos fatiados e embalados sob atmosfera protetora. Os resultados demonstraram que *Listeria monocytogenes* não é capaz de multiplicar-se no produto fumado. No entanto, foi demonstrado que o produto cozido permite a multiplicação de *Listeria monocytogenes* sendo que, o potencial de crescimento da população foi superior a 0,5 log ufc/g e a taxa máxima de crescimento da população bacteriana foi 0,08 log ufc/dia. Também foi estudado o possível efeito inibitório das bactérias ácido-lácticas naturalmente presentes nestes produtos. Os produtos estudados apresentavam fatores inibitórios como baixa atividade da água (a_w) e presença de altas concentrações de bactérias ácido lácticas, apesar de não se ter verificado uma relação inibitória estatisticamente significativa.

Palavras-chave: segurança dos alimentos, *Listeria monocytogenes*, produtos cárneos de aves, testes de desafio.

CHALLENGE TEST WITH *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN READY TO EAT POULTRY PRODUCTS

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen with relevance in food industry, especially in ready-to-eat products. According to Regulation (CE) No. 2073/2005 and its amendments on microbiological criteria for foodstuffs, food business operators must conduct life studies for each product produced. When these studies are inconclusive regarding food safety, food business operators should conduct additional studies, including tests investigating the susceptibility of a given micro-organism to grow or survive, when inoculated into the food, under reasonable storage conditions (referred to as challenge tests). The aim of this study was to perform a microbiological challenge test in cooked and smoked poultry products, in order to assess if these products are able to support the growth of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. It was also possible to determine for each product the potential growth of the bacteria and its maximum growth rate. These will permit to establish internal limits of the maximum allowable concentration of *Listeria monocytogenes* in a food that may be present on a given day of production, in order to comply with the limit of 100 colony-forming units (cfu)/g at the end of shelf-life, if authorized by the competent authority. The aim of this study was to perform a microbiological challenge test in cooked and smoked ready-to-eat poultry products, in order to assess if these products are able to support the growth of this pathogen and to assess the growth potential and the maximum growth rate. Two products were inoculated, a cooked product (turkey ham) and a smoked product (turkey sausage with garlic), sliced and packaged in modified atmosphere. Results showed that *Listeria monocytogenes* was not able to grow in the smoked product. However, it has been shown that the cooked product allows the growth of *Listeria monocytogenes* being that its growth potential was higher than 0.5 log cfu/g and the maximum growth rate was 0.08 log cfu/day. In addition, the possible inhibition effect of lactic acid bacteria on *Listeria monocytogenes* was studied. The studied ready-to-eat poultry products presented inhibitory factors, such as low water activity (a_w), presence of high counts of lactic acid bacteria, although there was no statistically significant inhibitory relationship.

Key Words: food safety, *Listeria monocytogenes*, poultry meat products, challenge test.

Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo..	ii
Abstract.....	iii
Índice Geral	v
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Abreviaturas	ix
Introdução.....	1
Parte I: Atividades desenvolvidas durante o estágio.....	4
Parte II: Revisão bibliográfica.....	7
1. Segurança dos Alimentos.....	7
2. As doenças de origem alimentar.....	13
2.1. Listeriose	16
2.1.1. A doença	16
2.1.2. Produtos alimentares associados à listeriose	19
2.1.3. Casos de listeriose na Europa e no Mundo.....	21
3. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
4. Controlo de <i>Listeria monocytogenes</i> na indústria alimentar	28
5. Legislação aplicável.....	34
6. Testes de desafio	38
Parte III: Trabalho experimental.....	40
1. Objetivos do estudo	40
2. Materiais e métodos	40
2.1. Fatores de seleção dos produtos alimentares utilizados nos testes de desafio... ..	40
2.2. Caracterização tecnológica dos produtos selecionados	41
2.3. Colheita de amostras	43
2.4. Avaliação de produtos e ambiente fabril quanto à presença de <i>Listeria monocytogenes</i> : obtenção de isolados para inoculação no produto.....	45
2.4.1. Pesquisa e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
2.4.2. Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR.....	48
2.4.3. Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> por API <i>Listeria</i>	50
2.5. Preparação do inóculo a utilizar nos testes de desafio.....	50
2.6. Método dos testes de desafio	52
2.7. Avaliação das características físico-químicas dos produtos.....	53

2.7.1.	Avaliação da concentração de gases na embalagem	53
2.7.2.	Determinação do pH.....	53
2.7.3.	Determinação da atividade da água (a_w)	54
2.8.	Avaliação microbiológica	54
2.8.1.	Preparação de amostras	54
2.8.2.	Contagem de microrganismos totais a 30°C	54
2.8.3.	Contagem de bactérias ácido lácticas	55
2.8.4.	Pesquisa e contagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	55
2.9.	Análise estatística dos resultados	55
3.	Resultados e discussão.....	57
3.1.	Obtenção de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i>	57
3.2.	Características do inóculo utilizado nos testes de desafio.....	59
3.3.	Resultados dos testes de desafio	60
3.3.1.	Características de concentração de gases dos produtos testados.....	60
3.3.2.	Características físico-químicas dos produtos testados	62
3.3.3.	Características microbiológicas dos produtos testados.....	64
3.3.4.	Avaliação dos produtos estudados quanto à suscetibilidade de suportar a multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
3.4.	Discussão geral dos resultados dos testes de desafio	71
4.	Conclusão	73
Parte IV: Referências bibliográficas		75
Parte V: Anexos		84
Anexo 1 – Árvore de decisão para decisão sobre estudos de vida útil.		84
Anexo 2 – Temperatura de armazenamento dos produtos nos testes de desafio		85
Anexo 3 – Poster publicado		86

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo dos principais agentes bacterianos associados a surtos de doenças de origem alimentar reportados pelos Estados Membros da União Europeia em 2016 (adaptado de EFSA & ECDC, 2017).	15
Tabela 2 - Resumo dos principais agentes associados a doenças de origem alimentar reportados nos Estados Unidos da América em 2016 (adaptado de CDC, 2017).	16
Tabela 3 - Fatores que influenciam a multiplicação e sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> (adaptado de CE/DG SANCO, 2008).	26
Tabela 4 - Características dos diferentes lotes de produtos utilizados nos testes de desafio.	44
Tabela 5 - Codificação das amostras utilizadas nos testes de desafio.	44
Tabela 6 - Amostras recolhidas para isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
Tabela 7 - Condições de realização de PCR para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> (adaptado de Simon et al., 1996; Talon et al., 2007).	49
Tabela 8 - Resultados obtidos nos diferentes métodos de pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> em todas as amostras analisadas.	57
Tabela 9 - Códigos das amostras, materiais usados e resultados obtidos na realização de PCR para deteção de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
Tabela 10 - Características de embalagem e atmosfera modificada dos produtos testados.	61
Tabela 11 - Características físico-químicas (pH e a_w) dos produtos testados.	63
Tabela 12 – Taxa de crescimento máxima da população de <i>Listeria monocytogenes</i> (log ufc/dia) ao longo do teste de desafio.	70
Tabela 13 - Reta de regressão dos produtos testados e valores de r^2	70

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama de Sankey- Notificações por presença de <i>Listeria monocytogenes</i> através do sistema RASFF nos diferentes tipos de produtos alimentares, com as diferentes origens de notificação e países de produção (European Commission, 2017).	20
Figura 2 - Tendência de casos humanos confirmados de listeriose na Europa entre 2008 e 2016 (adaptado de EFSA & CEDC, 2017).	21
Figura 3 - Meio Fraser (à esquerda) e meio Half Fraser (à direita). (fotografia original).....	47
Figura 4 - Colônias típicas de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria spp.</i> (Imagem da esquerda adaptada de BioMérieux, 2017) (Fotografia original à direita)	48
Figura 5 - Esquema de preparação da Mix de inóculo.	51
Figura 6 - Equipamentos utilizados no reembalamento das amostras que foram inoculadas.	52
Figura 7 – Medição de pH através do equipamento Meat pH Meter.	53
Figura 8 – Medição de aw usando o equipamento Rotronic.	54
Figura 9 - Resultados obtidos na realização de PCR para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	59
Figura 10 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e bactérias ácido lácticas no produto Salsichão de peru com alho (SP) durante os testes de desafio.....	65
Figura 11 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e de bactérias ácido lácticas no produto Fiambre magro de peru (FP) durante os testes de desafio.	66
Figura 12 - Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> no produto Salsichão de peru com alho (SP) durante os testes de desafio.	68
Figura 13 - Contagem de <i>Listeria monocytogenes</i> no produto Fiambre magro de peru (FP) durante os testes de desafio.	69

Índice de Abreviaturas

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point* (análise de perigos e controlo de pontos críticos)

PCC – ponto crítico de controlo

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

RTE - *Ready to Eat* (pronto a consumer).

a_w - Atividade da água

pH - Potencial de hidrogénio

NP - Norma Portuguesa

UE - União Europeia

EFSA - *European Food Safety Authority*

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CE - Comissão Europeia

EC - *European Commission*

log - Logaritmo de base 10

ufc - Unidades Formadoras de Colónias

ufc/g - Unidades formadoras de colónias por grama

ALOA - *Agar Listeria by Ottaviani & Agosti*

BHI - *Brain Heart infusion*

pb - pares de base

°C – Grau *Celsius*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDA - *Food and Drug Administration*

ISO - *International Organization for Standardization*

AT – Microrganismos totais a 30°C

BAL – Bactérias ácido lácticas

MRS - *Man, Rogosa and Sharpe*

OD – Densidade ótica

PCR - *Polymerase chain reaction*

WHO - *World Health Organization*

TSA - *Trypticase Soy agar*

µg - micrograma

g – Grama

µL - microlitro

ml – mililitro

mM - milimolar

μM - micromolar

% - percentagem

spp. – Espécies

sp. – Espécie

n – número de amostras

r^2 – coeficiente de determinação

p - probabilidade de significância

PFGE - *Pulse-field gel electrophoresis*

PrfA - *Listeria monocytogenes regulatory protein*

prfA - *PrfA encoding gene*

e - Número de Euler

USA – *United States of America*

EUA – Estados Unidos da América

MAP – *modified atmosphere packaging*

Introdução

A segurança dos alimentos é um tema de grande interesse mundial. Os alimentos, para além de fonte de energia e de nutrientes, podem ser causadores de doenças, denominadas doenças infecciosas de origem alimentar. Estas doenças podem levar ao aparecimento de sintomas preocupantes como meningite, morte fetal ou gastroenterite hemorrágica. Cada vez mais, através da comunicação social, são-nos comunicados surtos de doenças de origem alimentar no mundo. A população mundial está alerta para este tema e exige cada vez mais estar bem informada sobre os riscos que corre. Existem muitas dúvidas quanto à ocorrência de certas doenças, como a listeriose, que nos últimos anos, tem vindo a aumentar globalmente. Será devido a uma cada vez maior disponibilidade financeira das populações, que lhes permite o consumo de alimentos que normalmente não consumiam? Será devido à produção em maior escala e em ambientes cada vez mais industrializados, como muitos acreditam, com menos rigor em termos de higiene e boas práticas de fabrico ou existem outras causas? Estas são algumas das dúvidas que importam esclarecer. Apesar de nos últimos anos terem sido efetuados esforços para a monitorização de agentes patogénicos e surtos de doenças alimentares, ainda existe, um longo percurso a percorrer.

A listeriose humana é a doença causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*. A principal via de transmissão é o consumo de alimentos contaminados. A ubiquidade desta bactéria, as elevadas taxas de letalidade e a capacidade de se desenvolver lentamente a temperaturas de refrigeração são fatores que explicam o interesse das indústrias alimentares e das autoridades competentes neste agente patogénico e no seu controlo. *Listeria monocytogenes* pode causar duas formas de listeriose: invasiva e não invasiva (Allerberger & Wagner, 2010). Em indivíduos imunocompetentes, a listeriose desenvolve-se na sua forma não invasiva, como uma gastroenterite febril ou mesmo sem sintomas. Em indivíduos com idade superior a 65 anos, imunocomprometidos, mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos, a listeriose desenvolve-se na sua forma invasiva, podendo manifestar-se com septicémia, meningite, entre outras.

Os produtos prontos a consumir (RTE, *ready to eat*) são, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005 e respetivas alterações, alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos. Estes produtos são conservados a temperaturas de refrigeração, permitindo assim que a bactéria *Listeria monocytogenes* se multiplique no alimento (McLauchlin, 1996). De acordo com o relatório de atividades de monitorização de zoonoses (EFSA & ECDC, 2017) e com os relatórios do RASFF (European Commission, 2017), a presença de *Listeria monocytogenes* foi relatada nos seguintes produtos prontos a consumir: leite e produtos derivados, carnes e produtos derivados, peixe e produtos derivados, saladas, produtos de pastelaria e padaria, óleos e gorduras, vegetais e frutas.

A refrigeração é muitas vezes utilizada como meio de controlar ou diminuir a multiplicação de microrganismos patogénicos nos alimentos e o facto de a bactéria *Listeria monocytogenes* sobreviver e multiplicar-se nestas temperaturas, torna-a um desafio para a indústria alimentar. A carne de frango é cada vez mais consumida, devido ao seu preço relativamente baixo e por ser uma carne branca, nutricionalmente equilibrada, sendo muitas vezes aconselhado o seu consumo por muitos nutricionistas e profissionais de saúde. Este conselho aplica-se também aos produtos preparados e produtos à base de carne de frango, que são cada vez mais recomendados por conterem valores nutricionais mais equilibrados, relativamente aos macronutrientes e micronutrientes, comparativamente com outros produtos cárneos de outras espécies.

Em Portugal, foi estudada a prevalência de *Listeria monocytogenes* em diversos produtos comercializados, recolhidos ao nível do retalho e da indústria sendo que, os géneros alimentícios crus que apresentaram maiores taxas de não conformidade foram a carne de frango crua (60%), farinha (18,5%), carne vermelha crua (17,7%), leite cru (16,7%), vegetais congelados (12,9%) e peixe cru (12%). No entanto, a presença de *Listeria monocytogenes* é ainda mais alarmante em produtos prontos a consumir, sendo que os géneros alimentícios que registaram uma maior prevalência foram o fiambre (25%), frutos secos (8,3%), produtos de pastelaria (4,1%) e queijo fresco (4%) (Mena *et al.*, 2004).

Num outro estudo realizado também em Portugal, a frequência do género *Listeria* apresentou resultados que variam entre 30 a 100% em carnes de aves cruas, enquanto que de *Listeria monocytogenes* variou entre 12 a 60% (Fraqueza, Ferreira, & Barreto, 2006).

De acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005 e respetivas alterações, os operadores das empresas do sector alimentar responsáveis pelo fabrico do produto devem realizar estudos de vida útil a fim de verificar se os critérios microbiológicos definidos para cada categoria de alimento são cumpridos durante todo o período de vida útil dos produtos. Este mesmo Regulamento estipula que para os géneros alimentícios destinados a lactentes e/ou com fins medicinais, o limite definido é a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g em produtos colocados no mercado durante o período de vida útil. Em géneros alimentícios prontos a consumir classificados como suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, o critério estabelecido pelo Regulamento indica como limite a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de produto antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu, se este não puder ou conseguir demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao termo do período de vida útil. No entanto, se o fabricante de produto alimentar puder demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excede a concentração de 100 ufc/g até ao fim do seu período de vida útil, aplica-se o limite de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para estes produtos suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria*

monocytogenes, quando colocados no mercado durante o período de vida útil. Em alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos, o limite definido também é de 100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* para produtos colocados no mercado durante o período de vida útil.

Esta dissertação de mestrado é composta por uma parte de revisão bibliográfica, na qual é referida a importância da segurança dos alimentos, a caracterização da bactéria *Listeria monocytogenes* e da listeriose (doença provocada pela bactéria), as medidas de controlo utilizadas na indústria alimentar, a legislação em vigor relativa a bactéria *Listeria monocytogenes* e a explicação dos testes de desafio (*challenge test*) e seu objetivo.

O trabalho experimental desta dissertação consiste na realização de um estudo adicional ao estudo de vida útil de dois produtos suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, de forma a garantir que não são ultrapassados os limites legais exigidos para os produtos em questão durante o período de vida útil. O estudo adicional desenvolvido denomina-se teste de desafio e consiste em inocular o produto alimentar com *Listeria monocytogenes* e verificar se esse produto permite ou não a multiplicação da bactéria e caso esta multiplicação se verifique, qual a taxa de crescimento da população bacteriana, durante o seu período de vida útil.

Parte I: Atividades desenvolvidas durante o estágio

O estágio que deu origem a esta dissertação foi desenvolvido entre uma indústria alimentar que produz preparados de carne e produtos à base de carne de aves e o laboratório de tecnologia e segurança dos alimentos da faculdade de medicina veterinária da universidade de lisboa. Este estágio teve a duração de seis meses, aproximadamente 900 horas, que foram despendidas entre o estudo de produtos e processos e o desenvolvimento do trabalho experimental.

Numa primeira fase, foi importante conhecer a indústria alimentar em questão, sendo que as primeiras atividades desenvolvidas foram o acompanhamento da produção, conhecimento do processo de produção, equipamentos e formulações dos produtos utilizados e integração no ambiente fabril. Nesta indústria recebe-se carne de peru e frango frescas e produz-se preparados de carne de aves, produtos à base de carne de aves, produtos prontos a consumir e produtos pré-cozinhados.

De seguida, o autor teve a oportunidade de acompanhar o Departamento de Qualidade, que intervém ao longo de todo o processo de produção, desde a receção de matéria-prima até à expedição de produto acabado. As funções dos técnicos do departamento de qualidade incluem garantir que o HACCP implementado é cumprido em todas as etapas de produção, assegurar que todos os pré-requisitos estão corretamente implementados e são cumpridos, desde a rastreabilidade à formação do pessoal, assegurar o cumprimento das boas práticas de higiene e de laboração, realizar análises microbiológicas e físico-químicas de controlo do produto e da matéria-prima, desenvolvimento de novos produtos de acordo com as necessidades e solicitações do mercado, conduzir análises sensoriais aos produtos, acompanhar auditorias de clientes, acompanhar e responder a reclamações e devoluções de produto, desenvolver novas embalagens e etiquetas de acordo com o Regulamento (UE) nº 1169/2011, realizar testes de validade dos produtos, coordenar a gestão dos alergénios e criar condições para que no ambiente de produção todas as etapas envolvidas na manipulação, preparação e armazenamento de produto decorram segundo o plano HACCP desenvolvido e implementado na empresa. Durante estes seis meses o autor acompanhou e sempre que possível, participou nas atividades desenvolvidas pelos técnicos do departamento de qualidade. Todos estes processos exigem que sejam mantidos registos rigorosos de todos os parâmetros monitorizados. Para além de todas estas tarefas, a unidade em questão tem implementada a ISO 22000:2005, que é uma norma de certificação internacional que define os requisitos para um sistema de gestão da segurança dos alimentos. Esta norma exige uma série de procedimentos e inerente documentação, que foram também acompanhados durante este período de estágio.

Foi no laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa que foram realizadas todas as análises aos produtos em testes de desafio, bem como o armazenamento dos produtos em teste, que foram armazenados numa câmara de refrigeração do laboratório

da faculdade. Numa primeira fase, foi realizada uma introdução aos procedimentos, materiais e métodos do laboratório. De seguida, foi importante planear todo o ensaio dos testes de desafio, adquirir material necessário para a realização do ensaio e compreender o que iria ser necessário planear e preparar para um dia de análise aos produtos. Desta forma, todo o procedimento ficou bem planeado e foi bastante mais fácil realizar todos os procedimentos analíticos que eram necessários num curto espaço de tempo.

As análises realizadas incluíam contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C, pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*, contagem de bactérias ácido lácticas, verificação do pH e a_w dos produtos e da percentagem de gases (CO₂ e O₂) nas embalagens dos mesmos. Foi realizado primeiramente um ensaio durante 30 dias com 4 produtos suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* (dois produtos cozidos embalados em atmosfera modificada e vácuo e dois produtos fumados embalados em atmosfera modificada e vácuo), que permitiu verificar e planear o segundo ensaio, que é o descrito nesta dissertação e fazer as correções e ajustes necessários para a realização do segundo ensaio nas melhores condições possíveis.

Durante estes 6 meses de estágio o autor teve, pela primeira vez, contacto com o mundo do trabalho, tanto numa indústria alimentar, que já tinha percebido ser uma área na qual tinha bastante interesse e algum fascínio, como na área laboratorial, que foi essencial para entender como era efetuado o controlo de qualidade e segurança nos produtos alimentares e desenvolver o seu ensaio experimental. Este estágio teve a duração de 900 horas, sendo que foi necessário despende de alguns fins de semana para preparação do trabalho experimental. Foi bastante importante para o autor a realização deste estágio tendo em conta que foram meses de aprendizagem e desafios constantes, sentindo pela primeira vez a responsabilidade de conduzir e organizar um projeto com bastantes desafios. Foi muito importante também o contacto com esta indústria alimentar, uma vez que, para além de todo o conhecimento adquirido, o autor teve a certeza que era uma área com imenso interesse e na qual gostaria de trabalhar futuramente, sendo que, ainda hoje se sente fascinada e continua a trabalhar na área alimentar, mais especificamente na área de qualidade e segurança dos alimentos.

O contacto com a área laboratorial permitiu também a realização de um segundo estágio, ao abrigo do programa Erasmus, no laboratório de Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Copenhaga, na Dinamarca, durante 3 meses, sob a orientação da Professora Marianne Halberg Larsen. Neste segundo estágio, o autor contactou com o departamento de segurança dos alimentos e este contato permitiu que tivesse acesso às tecnologias mais recentes e à investigação de topo mundial. Foram acompanhados alguns alunos de doutoramento nos seus projetos, assistiu a diversos seminários e apresentações de teses de doutoramento, diversos ensaios experimentais e em específico, o autor foi incluído na investigação de espécies de bactérias lácticas que poderiam ter algum impacto no desenvolvimento de microrganismos patogénicos, sendo que chegou mesmo a testar o efeito

inibitório de *Lactobacillus salivarius* em espécies patogénicas, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*, na carne de frango crua. É importante referir também, o quão enriquecedor foi para o autor esta experiência internacional, sendo acompanhadas de perto diversas investigações na área da segurança dos alimentos e o contacto diário com diferentes culturas e pessoas com experiências e *backgrounds* diferentes.

Parte II: Revisão bibliográfica

1. Segurança dos Alimentos

O conceito de segurança dos alimentos é muito amplo e é utilizado muitas vezes de forma imprecisa (Araújo, 2007). Já em 2004, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* [WHO], 2004) referia que *Food security* é por vezes confundida com *Food safety*, porque as palavras *security* e *safety* são sinónimos em muitas línguas.

Segundo o *Codex Alimentarius* (2011), *Food Safety* é definido como “conjunto de medidas para que os alimentos não causem danos ao consumidor – através de perigos biológicos, químicos ou físicos – quando são preparados e ou consumidos de acordo com o uso esperado”. Atualmente são considerados como perigos biológicos todos os perigos microbiológicos, incluindo os parasitas, como perigos químicos todos os perigos radiológicos, pesticidas, resíduos medicamentosos, toxinas naturais (como micotoxinas), compostos em decomposição, ingredientes ou aditivos não aprovados e alergénios e como perigos físicos todos os fragmentos de pedra, metal ou vidro. Estes conceitos têm sido cada vez mais explorados na indústria alimentar devido à implementação de sistemas de gestão da qualidade e segurança dos alimentos aprovados pelo GFSI (*Global Food Safety Initiative*), como as normas BRC (*British Retail Consortium*, 2015), IFS Food (*International Featured Standards*, 2017) e FSSC 22000 (*Food Safety System Certification*, 2017) e também pelo *Food Safety Modernization Act* nos Estados Unidos da América (*Food and Drug Administration* (FDA), 2016).

Apenas estão incluídos no *Food Safety* (segurança dos alimentos) todos os perigos que resultam de contaminação accidental, não voluntária. Se a contaminação for intencional sairá do âmbito do *Food safety*, e incidirá no campo do *Food Defense* (defesa dos alimentos), outro conceito que é bastante recente e cada vez mais falado, muito devido às normas aprovadas pelo GFSI (BRC, 2015; IFS, 2017; FSSC 22000, 2017) e desenvolvido nos Estados Unidos da América (EUA) após o ataque terrorista de 11 de setembro de 2001 (*Institute of Medicine and National Research Council*, 2010). Esta decisão deveu-se ao facto de se acreditar que a indústria alimentar poderia ser alvo de ataques terroristas, que poderiam ter consequências graves nas populações, e até à data não existiam medidas para prevenir, identificar e proceder no caso de ataque terrorista.

O conceito de *Food Security* (segurança alimentar) está ligado à disponibilidade de alimentos, sendo que surgiu na década de 70, aquando da crise alimentar global. Em 2001, a FAO (*Food and Agriculture Organization*, 2001), atualizou a definição de *Food security* definindo este conceito da seguinte forma: “*Food security* existe quando todas as pessoas, a qualquer momento, têm acesso físico, social e económico a alimentos suficientes, seguros e nutritivos, que permitam satisfazer as suas necessidades em nutrientes e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável”.

A EFSA (*European Food Safety Agency*) tem apenas atribuições no âmbito do *Food Safety*, mas outras agências de países membros (como por exemplo a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE]) tem funções mais alargadas, o que também tem contribuído para esta mistura de conceitos (Araújo, 2007).

Neste trabalho será apenas referido o termo segurança dos alimentos, sendo que este termo se refere sempre ao conceito do *Food Safety*.

A segurança dos alimentos surge como uma preocupação fulcral em muitos países sendo um dos desafios a atingir no século XXI. O seu objetivo é melhorar a qualidade de vida das populações, proporcionando assim, a possibilidade de uma vida mais saudável (Fraqueza *et al.*, 2006).

A alimentação e a saúde são duas questões muito relacionadas entre si e têm uma importância essencial na vida de uma população. Como se descreve num relatório da FAO (1999), existe um provérbio já antigo, mas atual, que diz que “nós somos aquilo que comemos”, ou seja, o nosso estado nutricional, a nossa saúde e as nossas faculdades físicas e mentais dependem dos alimentos e nutrientes que ingerimos.

A segurança dos alimentos implica a ausência (ou presença a níveis seguros e aceitáveis) de agentes patogénicos, contaminantes, adulterantes, toxinas naturais ou outras substâncias prejudiciais que possam influenciar a segurança do alimento e torná-lo nocivo para a saúde, levando ao desenvolvimento de doenças de carácter agudo ou crónico. As populações estão cada vez mais em alerta para a temática da segurança dos alimentos sendo que, os próprios meios de comunicação fazem chegar cada vez mais informação relativa a este tópico. Atualmente as populações estão muito mais informadas em relação à sua alimentação e à relação entre os alimentos e a sua saúde e por isso mesmo, hoje em dia os consumidores já tomam atitudes de proteção e fazem compras de alimentos de uma forma consciente. Cada vez mais livros têm sido publicados sobre a influência da alimentação na saúde, como por exemplo, alimentos utilizados para a prevenção de doenças. Os consumidores conseguem relacionar cada vez mais os alimentos com risco de doença e problemas de saúde.

Num estudo desenvolvido em Espanha pela Fundação Eroski (2007), em que foram questionados consumidores espanhóis quanto à confiança que têm nos alimentos, concluiu-se que os alimentos considerados como produtos “mais perigosos” pelos consumidores são produtos como a maionese (muito relacionada com problemas de segurança dos alimentos por 62% dos entrevistados), os ovos (48%), as refeições pré-cozinhadas e os alimentos prontos a consumir (46%), enquanto que o peixe (30%), carne (30%) e frutas e legumes (13%) são considerados “menos perigosos”, ou seja, menos relacionados com problemas de segurança dos alimentos. É referido também neste estudo que se verifica que à medida que a idade aumenta e o estado socioeconómico diminui, a perceção de risco entre o consumo desses produtos e a ocorrência de doenças de origem alimentar diminui.

A segurança dos alimentos envolve o governo, ministérios, direções gerais e autoridades que juntamente com as indústrias alimentares, as cadeias de distribuição e de armazenamento e a restauração, previnem o aparecimento de doenças de origem alimentar que possam afetar a população, assegurando que a inocuidade e qualidade dos alimentos não é comprometida em toda a cadeia alimentar (Iranzo, Navarro, Gascó, Carntón, & Cucart, 2015).

A importância e envolvimento da indústria alimentar na segurança dos alimentos é muito grande, sendo que, a indústria é o ponto na cadeia alimentar onde, nas últimas décadas, se desenvolveram maiores esforços no sentido de prevenir problemas de segurança e qualidade alimentar. A implementação e melhoramento das boas práticas de laboração e de higiene, a promoção de estruturas, equipamentos e instalações que facilitem a higienização diária, o controlo analítico de superfícies e produtos, o controlo de todos os fatores que possam influenciar a produção de alimentos seguros, as vistorias das entidades e autoridades, os processos de certificação por sistemas de gestão da segurança dos alimentos, entre outros, são tudo medidas implementadas nas últimas décadas que contribuíram certamente para a minimização das doenças de origem alimentar (Iranzo *et al.*, 2015).

Em resposta a mercados e consumidores cada vez mais informados e exigentes, a indústria alimentar está cada vez mais sensibilizada sobre a temática da segurança dos alimentos e empenhada para que toda a cadeia alimentar seja alvo de um controlo mais apertado e constante (Iranzo *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, o governo, entidades e autoridades competentes também aumentaram de forma notável os controlos e a legislação para assegurar a inocuidade e a qualidade dos alimentos. Neste sentido, a União Europeia (UE) tem vindo a desenvolver legislação alimentar, cujos princípios gerais estão estabelecidos no Regulamento (CE) nº 178/2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Toda a legislação no âmbito alimentar se destina a assegurar um nível elevado de proteção da saúde e vida da população, tendo em conta desde o bem-estar animal, os aspetos fitossanitários e o meio ambiente, lembrando sempre o lema “do prado ao prato”, que é considerado como um princípio geral da política de segurança dos alimentos da UE.

A sigla HACCP é a abreviatura de *Hazard Analysis and Critical Control Point* (Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos). Segundo a ASAE, o sistema de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) tem na sua base uma metodologia preventiva, com o objetivo de evitar potenciais riscos que possam causar danos aos consumidores, através da eliminação ou redução de perigos, de forma a garantir que não sejam colocados, à disposição do consumidor, alimentos não seguros (Mil-Homens, 2007).

O sistema HACCP foi desenvolvido nos anos 60 pela empresa americana Pillsbury Company, em conjunto com a NASA - *National Aeronautics and Space Administration*- e o *U.S. Army*

Laboratories em Natick, com o objetivo de produzir alimentos seguros para o projeto APOLO, do programa espacial dos Estados Unidos. Este sistema tinha como objetivo o fornecimento de alimentos seguros para os astronautas da NASA, de forma a que não ficassem doentes durante o programa espacial, sem que todos os alimentos tivessem de ser testados laboratorialmente, o que seria extremamente dispendioso (Mil-Homens, 2007).

Em 1993, a União Europeia aprovou a Diretiva 93/43/CEE, que indica que as empresas do sector alimentar devem identificar todas as fases determinantes para garantir a segurança dos alimentos e velar pela criação, aplicação, atualização e cumprimento de procedimentos de segurança adequados, com base nos princípios do sistema HACCP. Esta diretiva foi transposta em 1998 para a ordem jurídica nacional através do Decreto-Lei n.º 67/98, que no seu artigo 3.º refere que as empresas do sector alimentar devem identificar todas as fases das suas atividades de forma a garantir a segurança dos alimentos e velar pela criação, aplicação, atualização e cumprimento de procedimentos de segurança adequados, através de atividades de autocontrolo e com base nos princípios do HACCP.

Em 2006, o Regulamento (CE) n.º 852/2004, que revoga a Diretiva 93/43/CEE, estipula, no seu artigo 5.º, que todos os operadores do sector alimentar devem criar, aplicar e manter um processo ou processos permanentes baseados nos 7 princípios do HACCP e é transposto para a ordem jurídica nacional pelo Decreto-Lei n.º 113/2006.

Todas as empresas do sector alimentar que produzam, transformem, distribuam e/ou armazenem géneros alimentícios são assim obrigadas a criar e manter este sistema. De acordo com o Regulamento (CE) n.º 852/2004, um plano HACCP assenta em 7 princípios fundamentais:

- Princípio 1: Identificação e análise de perigos, sendo que, devem ser identificados quaisquer perigos que devam ser evitados, eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis;
- Princípio 2: Identificação e determinação dos pontos críticos de controlo (PCC) na fase ou fases em que o controlo é essencial para evitar ou eliminar um risco ou para o reduzir para níveis aceitáveis;
- Princípio 3: Estabelecimento de limites críticos em cada PCC, que separem a aceitabilidade da não aceitabilidade com vista à prevenção, eliminação ou redução dos riscos identificados;
- Princípio 4: Estabelecimento e aplicação de um sistema de monitorização ou vigilância dos PCC;
- Princípio 5: Estabelecimento de ações ou medidas corretivas que devem ser aplicadas quando a monitorização indicar que um ponto crítico de controlo não se encontra sob controlo ou seja, quando existir um desvio relativamente ao limite definido para o PCC;

- Princípio 6: Estabelecimento de procedimentos de verificação, a efetuar regularmente de forma a garantir que o PCC está a ser corretamente controlado;
- Princípio 7: Elaboração de um registo ou documentação que demonstre a correta monitorização do PCC e se necessário, a aplicação de medidas corretivas.

A estes princípios são adicionadas etapas preliminares que são fundamentais para a construção de um plano devidamente adequado: constituição da equipa HACCP, descrição do produto, construção do fluxograma com todas as etapas de produção e a sua confirmação no local de produção. Para a correta implementação deste plano deverá também existir previamente um manual adequado de procedimentos de boas práticas de higiene e de laboração e um programa de pré-requisitos (controlo de pragas, água, temperaturas, infraestruturas e layouts, manutenção, medidas de prevenção da contaminação cruzada, gestão de alergénios, higiene, entre outros) que suportem o plano HACCP implementado, tal como também é descrito no Regulamento (CE) nº 852/2004.

A segurança dos alimentos envolve toda a cadeia alimentar, desde práticas na agricultura até às técnicas de cozinha num restaurante, passando pelos cada vez mais complexos sistemas de processamento industrial e elaboração de alimentos. A análise dos perigos e dos pontos críticos de controlo é considerada fulcral e deve ser realizada ao longo de toda a cadeia de produção de alimentos de modo a que se garanta a produção de alimentos seguros (Fraqueza *et al.*, 2006)

Ao mesmo tempo, a segurança dos alimentos é um assunto interdisciplinar que envolve bastantes fatores, tais como perigos químicos, físicos e biológicos, relaciona-se com a saúde pública, microbiologia, higiene e com fatores sociológicos e culturais de uma população (como por exemplo, hábitos de consumo e práticas de confeção de alimentos).

Quando se fala de HACCP, muitas vezes falamos de perigo e risco, sendo que, estes dois conceitos poderão ser facilmente confundidos. Entende-se como “perigo” algo que possa causar danos ao consumidor e como “risco” a probabilidade e severidade de um perigo causar dano (Fraqueza *et al.*, 2006).

De acordo com princípio 1 da metodologia HACCP, na análise de perigos são identificados todos os potenciais perigos que possam causar danos aos consumidores em cada etapa do fluxograma, ou seja, em cada etapa do processamento ou fabrico do produto. Após a identificação de todos os perigos, é calculado o risco associado a cada um dos perigos, sendo que, se define como ponto crítico de controlo (PCC) uma etapa em que foi identificado um perigo que pode ser eliminado ou pode ser reduzida a sua probabilidade de ocorrência. O ponto crítico de controlo é uma etapa que deverá ser monitorizada através de processos eficazes de vigilância e monitorização, sendo que, deverão ser estabelecidas e descritas quais as medidas implementadas, quais os limites críticos aceitáveis para cada medida de controlo, como, quando, por quem e onde é realizada a monitorização e quais as correções e ações corretivas em caso de desvio, de acordo com o Regulamento (CE) nº 852/2004. Outro

conceito que se torna importante esclarecer é a diferença entre correção e ação corretiva, sendo que, correção é a medida que deve ser tomada imediatamente de forma a corrigir a não conformidade e ação corretiva, a medida para eliminar as causas da não conformidade. Os limites críticos devem então ser estabelecidos para cada PCC baseados em valores presentes na legislação ou fundamentados cientificamente (Afonso, 2006). Devem também estar sempre disponíveis registos ou documentação que comprovem que os PCC estão a ser monitorizados com a frequência exigida e que estão a ser tomadas medidas corretivas quando se observa algum desvio em relação ao limite crítico do PCC.

Um exemplo clássico de um PCC identificado na indústria alimentar é a etapa de cozedura, onde o perigo identificado é biológico e o perigo que existe nesta etapa é a sobrevivência dos microrganismos patogénicos presentes nos produtos, caso os limites definidos para a etapa não sejam cumpridos.

A medida de controlo deste PCC é o controlo do binómio tempo temperatura da cozedura, de forma a verificar se os limites críticos são cumpridos. Os limites críticos são definidos com base em bibliografia e experiência do técnico que implementa o plano HACCP. O tempo e a temperatura de cozedura devem ser suficientes para assegurar que no centro térmico do produto são eliminados os microrganismos patogénicos e reduzida a restante carga microbiana do produto. É importante ter em conta, que nos programas de cozedura definidos para equipamentos de cozedura em indústrias alimentar, muitas vezes a temperatura monitorizada é a temperatura ambiente do equipamento de cozedura ou a temperatura superficial dos produtos, sendo que, o tempo de destruição microbiana referido na bibliografia só pode ser tido em conta a partir do momento em que a temperatura do centro térmico do produto é atingida e nunca a temperatura ambiente ou a temperatura superficial do alimento. É importante também que o binómio tempo temperatura seja validado, de forma a estar comprovado que o método utilizado é eficaz. Para um programa de cozedura definido para um alimento a nível industrial, por exemplo, a validação deste PCC é realizada verificando se alimentos que foram submetidos ao tratamento térmico definido nesse programa (tempo e temperatura), atingem a temperatura no centro térmico do alimento durante o tempo definido na bibliografia e estão conformes em termos microbiológicos, através de análises. Deve também ser definido para cada PCC quem, quando e como é realizada a monitorização do mesmo.

No caso de existir um desvio, ou seja, no caso de não ser cumprida a temperatura ou tempo de cozedura definido para o alimento, a correção a realizar deverá ser reprocessar o produto e se isto não for possível ou se não existirem evidências claras que o binómio de tempo temperatura foi cumprido, rejeitar o produto. Deverá ser também solicitada a intervenção da manutenção em caso de avaria do equipamento.

A medida corretiva, ou seja, a medida que poderá ser tomada de forma a que não volte a acontecer o mesmo desvio é a reparação do equipamento em caso de avaria e reavaliação

do plano de manutenção do equipamento, revalidação do PCC, avaliar a causa do desvio e verificar se é possível aplicar medida corretiva para evitar reincidência da causa.

Se existir alguma falha no controlo de pontos críticos de controlo, o perigo não será eliminado e o alimento não será seguro para consumo.

2. As doenças de origem alimentar

As doenças de origem alimentar são doenças causadas pela ingestão de alimentos. Estas doenças têm sintomas que podem variar bastante, dependendo do agente etiológico, que tais como bactérias, vírus, parasitas, toxinas, materiais contaminantes (como a melamina e as dioxinas, por exemplo), metais pesados, priões, entre outros.

As doenças de origem alimentar, como já descrito, são alvo de grande preocupação mundial. Estas doenças são uma grande causa de morte humana e as suas consequências são significativas para a saúde e bem-estar das pessoas, tendo também consequências económicas. Nos EUA, foi realizado um estudo para determinar o impacto económico causado por doenças de origem alimentar com origem nos 14 agentes patogénicos mais frequentes, tendo sido estimado um custo anual de 14000 milhões de dólares americanos, aproximadamente 12000 milhões de euros. O custo da listeriose nos EUA, em 2012, era de 2600 milhões de dólares, aproximadamente 2328 milhões de euros (Iranzo *et al.*, 2015).

Segundo o relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015), que determina o impacto das doenças de origem alimentar na Europa, estima-se que mais de 23 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente, sendo que, 3 milhões têm menos de 5 anos de idade. É estimado também que cerca de 5000 pessoas morram anualmente devido a doenças de origem alimentar e a mortalidade infantil (crianças com menos de 5 anos) representa 14% do número total de mortes. Neste relatório foi descrito também que a listeriose é uma doença menos frequente na Europa, no entanto, é considerada uma doença severa, que causa aproximadamente 400 mortes por ano, principalmente nos grupos de risco como grávidas, recém-nascidos, idosos e imunodeprimidos. De acordo com a *European Food Safety Authority* e o *European Center for Disease Prevention and Control* (EFSA & ECDC, 2017), as infeções por *Listeria monocytogenes* são mais comumente reportadas no grupo de idades acima dos 64 anos.

Globalmente existem factos alarmantes sobre as doenças de origem alimentar, estimando-se que uma em cada dez pessoas (aproximadamente 600 milhões de pessoas) têm uma doença de origem alimentar por ano, são perdidos 33 milhões de anos de vidas saudáveis (perda de qualidade de vida) e morrem aproximadamente 420 mil pessoas, sendo que, um terço destas mortes são em crianças com menos de 5 anos de vida (WHO, 2015).

Na União Europeia, de acordo com a Diretiva 2003/99/CE, a EFSA (*European Food Safety Authority*) é a responsável pela análise de dados procedentes de zoonoses, resistência antimicrobiana e surtos alimentares recolhidos pelos Estados membros. A EFSA, em

conformidade com o Regulamento (CE) nº 178/2002, é a autoridade competente pela recolha e análise dos dados científicos, a identificação de riscos emergentes e por dar apoio científico à comissão, especialmente em casos de crises de origem alimentar. Com base nesta informação, elabora um relatório anual classificando os resultados de amostras positivas obtidas de *Listeria monocytogenes*, entre outros, por alimento e por país.

De acordo com o relatório da EFSA & ECDC (2017) que apresenta os resultados das atividades de monitorização de zoonoses realizadas em 2016, em 37 Países europeus (2017), a infeção por *Campylobacter* continua a ser a zoonose com mais casos reportados na Europa, representando quase 70% dos casos, no entanto, não se verifica crescimento significativo da campilobacteriose entre 2012 e 2016. A salmonelose já não está em tendência decrescente, como se verificava desde 2008, sendo que entre 2012 e 2016, o número de casos manteve-se. A salmonelose foi a doença de origem alimentar com mais surtos de doenças de origem alimentar na Europa, sendo que, cada um de seis casos, foi devido a *Salmonella enteritidis*. A proporção de salmonelose humana devido a *S. enteritidis* continuou a aumentar em 2016, tal como se tinha verificado nos anos anteriores. A presença de *Salmonella spp.* nos ovos é a combinação agente patogénico/alimento de risco mais elevada, tal como também já se tinha vindo a verificar nos anos anteriores. Em relação à *Listeria monocytogenes*, verificou-se uma tendência crescente, estatisticamente significativa, de casos de listeriose confirmados na Europa entre 2008 e 2016, bem como, durante o período de 2012 a 2016. Com base nos dados sobre a gravidade destas zoonoses, a listeriose foi a doença mais severa, com a maior taxa de hospitalização e letalidade na Europa. Um em cada seis casos confirmados e relatados de listeriose, foram fatais. A tendência decrescente da UE para casos confirmados de yersiniose desde 2008 estabilizou durante o período entre 2012 e 2016 e também o número de casos confirmados de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC).

Neste relatório (EFSA & ECDC, 2017) sobre o ano de 2016, foram relatados 4786 surtos de doenças de origem alimentar ou provenientes do consumo de água por 27 estados-membros. Outros 108 surtos foram notificados por sete não-estados-membros. Na UE, em comparação com 2015, o número de surtos, doenças e mortes devido a doenças de origem alimentar aumentou, mas o número de hospitalizações diminuiu. A maioria dos surtos foram associados a agentes bacterianos. As toxinas bacterianas ocuparam o segundo lugar, seguidas pelos vírus e parasitas. O resumo dos principais agentes bacterianos atribuídos a surtos de doenças de origem alimentar, reportados pelos Estados Membros da União Europeia em 2016, estão apresentados na tabela 1. Foram reportados, só em 2016, 14823 casos associados a surtos de doenças de origem alimentar, 2149 hospitalizações e 16 mortes.

Tabela 1 - Resumo dos principais agentes bacterianos associados a surtos de doenças de origem alimentar reportados pelos Estados Membros da União Europeia em 2016 (adaptado de EFSA & ECDC, 2017).

Agente patogénico	Casos	% de casos	Hospitalizações	% de Hospitalizações	Mortes	% de Letalidade
<i>Campylobacter spp.</i>	4606	31	140	3,0	0	0,0
<i>Salmonella spp.</i>	9061	61	1766	19,5	10	0,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	25	0	14	56,0	2	8,0
<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	735	5	125	17,0	3	0,4
<i>Vibrio spp.</i>	76	1	50	65,8	0	0,0
<i>Yersinia spp.</i>	41	0	3	7,3	0	0,0
Outros agentes bacterianos	279	2	51	18,3	1	0,4
Total	14823		2149		16	

Um grande problema da investigação e estudo destas doenças de origem alimentar, é que na sua grande maioria não se chega a determinar o agente etiológico.

A maior parte dos casos de surtos de doença de origem alimentar na Europa em 2016 são devido aos agentes patogénicos *Salmonella spp.* (61%), *Campylobacter spp.* (31%) e *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (5%). Podemos verificar também, pelos dados apresentados na tabela 1, que a listeriose associada a surtos e não incluída em casos esporádicos teve uma taxa de letalidade de aproximadamente 8%, superior a qualquer outro agente patogénico.

Em casos não associados a surtos, foram registados 2536 casos confirmados de listeriose na Europa e morreram 247 pessoas apenas no ano de 2016 devido a listeriose. A taxa de letalidade da listeriose durante o ano de 2016 foi de 16,2% (EFSA & ECDC, 2017).

De acordo com o centro de controlo de doenças e prevenção (CDC) dos EUA, que tem acesso aos dados de aproximadamente 15% da população americana, os principais agentes patogénicos das doenças de origem alimentar da população americana são 7 bactérias (*Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* (STEC), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.* e *Yersinia spp.*) e 2 parasitas (*Cryptosporidium spp.* e *Cyclospora spp.*). Os dados fornecidos pela FoodNet (CDC, 2017) das doenças de origem alimentar da população americana referentes ao ano de 2016, correspondem a um total de 19412 casos confirmados, 4622 hospitalizações e 81 mortes (CDC, 2017).

A maior parte dos casos estudados de doença de origem alimentar nos EUA são devido aos agentes patogénicos *Salmonella spp.* (39%), *Campylobacter spp.* (30%) e *Shigella spp.* (12%). *Listeria monocytogenes* foi responsável por aproximadamente 1% dos casos de doenças de origem alimentar em 2016. Apesar de existirem muitos menos casos de listeriose, comparando com os outros agentes patogénicos, a maior taxa de letalidade corresponde à *Listeria monocytogenes* (13,4%), sendo uma taxa bastante superior aos restantes agentes patogénicos (*Campylobacter spp.* – 0,2%; *Cryptosporidium spp.* – 0,2%; *Cyclospora spp.* – 0,0%; *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga – 0,2%; *Salmonella spp.* – 0,5%; *Shigella spp.* – 0,1%; *Vibrio spp.* – 1,8%; *Yersinia spp.* – 1,5%). O resumo de casos estudados está espelhado na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo dos principais agentes associados a doenças de origem alimentar reportados nos Estados Unidos da América em 2016 (adaptado de CDC, 2017).

Agente patogénico	Casos	% de casos	Hospitalizações	% de Hospitalizações	Mortes	% de Letalidade
<i>Campylobacter spp.</i>	5782	30	1082	18,7	10	0,2
<i>Cryptosporidium spp.</i>	1816	9	291	16,0	3	0,2
<i>Cyclospora spp.</i>	55	0	3	5,5	0	0,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	127	1	123	96,9	17	13,4
<i>Salmonella spp.</i>	7554	39	2163	28,6	39	0,5
<i>Shigella spp.</i>	2256	12	519	23,0	2	0,1
<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	1399	7	326	23,3	3	0,2
<i>Vibrio spp.</i>	218	1	61	28,0	4	1,8
<i>Yersinia spp.</i>	205	1	54	26,3	3	1,5
Total	19412		4622		81	

2.1. Listeriose

2.1.1. A doença

A listeriose humana é a doença causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*. A principal via de transmissão é o consumo de alimentos contaminados (Allerberger & Wagner, 2010; EFSA & ECDC, 2017). No entanto, a infeção também pode ser transmitida, embora muito raramente, através do contacto com animais infetados, manifestando-se inicialmente como uma infeção

cutânea em indivíduos cujas profissões são de risco, particularmente veterinários (McLauchlin & Low, 1994; Allerberger & Wagner, 2010; Pita, 2012; Iranzo *et al.*, 2015). Também foi reportado a via de transmissão nosocomial no período neonatal através de contaminação cruzada por utensílios utilizados por profissionais de saúde (McLauchlin, 1996; Allerberger & Wagner, 2010). *Listeria monocytogenes* foi isolada nas fezes de humanos adultos saudáveis, assim como de indivíduos em contacto com pacientes infetados (Schuchat, Swaminathan & Broome, 1991; Allerberger & Wagner, 2010).

A listeriose pode ocorrer como infeção generalizada, com septicémia, ou como uma infeção localizada num sistema/órgão específico (Schuchat *et al.*, 1991).

A bactéria *Listeria monocytogenes* pode causar duas formas de listeriose: invasiva e não invasiva (Allerberger & Wagner, 2010). Em indivíduos imunocompetentes, a listeriose desenvolve-se na sua forma não invasiva, como uma gastroenterite febril ou mesmo assintomática. Em indivíduos com idade superior a 60 anos, imunocomprometidos, mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos, a listeriose desenvolve-se na sua forma invasiva, podendo manifestar-se como septicémia, meningite, encefalite, morte fetal, aborto, doença grave do recém-nascido, infeções focais ou outras formas graves.

A listeriose apresenta uma sazonalidade evidente, sendo associada aos Verão e Outono (EFSA & ECDC, 2017). Esta sazonalidade poderá ser devida ao aumento de temperatura e dificuldade em manter os alimentos em temperaturas de armazenamento adequadas, o que potencia o desenvolvimento e multiplicação de *Listeria monocytogenes*.

Esta doença é de notificação obrigatória em Portugal desde 2014, como definido no Despacho n.º 5681-A/2014.

Os sintomas iniciais da listeriose não são muito específicos, dificultando assim o seu diagnóstico. O período de incubação médio é de 3 semanas, sendo que, os sintomas podem aparecer entre 3 a 70 dias após a exposição ao agente patogénico. Os sintomas mais comuns associados à infeção no SNC (forma invasiva em adultos não grávidos) são: febre, ataxia, convulsões, alteração do estado mental e perda de consciência (Schuchat *et al.*, 1991).

A *Listeria monocytogenes* também pode produzir uma grande variedade de infeções focais: casos de conjuntivite, infeção cutânea, linfadenite, abscesso hepático, abscesso cerebral, colecistite, peritonite, abscesso esplênico, infeção pleuropulmonar, infeção articular, osteomielite, pericardite, miocardite, arterite, fascite necrotizante e endoftalmite (Bortolussi, 2008; Allerberger & Wagner, 2010). Em grávidas poderá manifestar-se com sintomas semelhantes a uma gripe ou poderão mesmo não existir sintomas, no entanto pode levar a aborto, geralmente no decorrer do último terço de gestação, nascimento de um nato-morto, sepsis ou meningite no recém-nascido (Allerberger & Wagner, 2010).

Os grupos de risco são indivíduos com idade superior a 60 anos, imunocomprometidos, mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos, tal como já referido (EFSA & ECDC, 2017). Num estudo desenvolvido por Rocourt (1996) avaliou-se os indivíduos que apresentam maior risco

de contrair listeriose, concluindo-se que, por ordem decrescente de risco são: pacientes que tenham sofrido um transplante de órgãos, pacientes com SIDA, mulheres grávidas, pessoas com cancro e idosos.

A listeriose é diagnosticada quando se realiza cultura de sangue, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, placenta, mecónio, fezes, lavagens gástricas ou mesmo colheitas nos ouvidos, como no caso dos recém-nascidos (Allerberger & Wagner, 2010).

A terapia deve ser iniciada o mais rapidamente possível, sendo que, o tratamento de escolha deve ser antibioterapia com ampicilina ou penicilina individualmente ou em combinação com a gentamicina. O protocolo com gentamicina não deve ser utilizado em grávidas porque pode ter efeitos teratogénicos (Allerberger & Wagner, 2010).

Apesar de quase todas as estirpes de *Listeria monocytogenes* serem suscetíveis à maioria dos antibióticos, a taxa de cura é apenas de 70% (Pita, 2012). A combinação mais utilizada no tratamento de listeriose é ampicilina 2 g IV a cada 4 horas em combinação com gentamicina a uma dose de 1-2 mg / kg IV a cada 8 horas (McNeill, Sisson, & Jarrett, 2017). No sentido de evitar recaídas, a antibioterapia deve ser prolongada por, pelo menos, 2 semanas, mas pacientes com meningite ou envolvimento do sistema nervoso central devem fazer, pelo menos, 3 semanas de antibioterapia. No caso de existir endocardite, encefalite ou abscessos cerebrais pode ser necessário realizar um tratamento ainda mais longo e com doses mais elevadas de antibióticos (Allerberger & Wagner, 2010; McNeill *et al.*, 2017).

A dose infetante depende de diversos fatores, incluindo o estado imunológico do hospedeiro, número de bactérias ingeridas e as características da estirpe em questão (Schuchat *et al.*, 1991; Iranzo *et al.*, 2015). Em adultos saudáveis e imunocompetentes, as doses de *Listeria monocytogenes* que causam listeriose variam entre 10^5 até 10^9 ufc/g ou ml. No entanto, para os grupos de risco, as doses infetantes são mais baixas, variando entre < 10 a 10^4 ufc/g. Contudo, estas estimativas estão sujeitas a grande incerteza. Desenvolveram-se inúmeros modelos matemáticos preditivos que relacionam a dose de *Listeria monocytogenes* ingerida com a probabilidade de causar doença. A equação de um dos modelos preditivos (World Health Organization & Food and Agriculture Organization [WHO/FAO], 2004) é:

$$P = 1 - e^{-r \log_{10}(n)}$$

Sendo que, P é a probabilidade de doença grave, n é a dose ingerida (número de células de *Listeria monocytogenes* ingeridas) e r, a probabilidade de interação entre o microrganismo e o hospedeiro.

Foi observado (WHO/FAO, 2004) que a probabilidade de contrair listeriose é 100 vezes superior em pessoas vulneráveis (imunodeprimidas) do que em pessoas saudáveis (imunocompetentes). A suscetibilidade do hospedeiro é da maior importância no desenvolvimento de sinais clínicos (Rocourt, 1996).

A educação e informação dos consumidores é de extrema importância para a prevenção da listeriose, principalmente dos grupos de risco. Apesar de já existir algum cuidado e atenção dos profissionais de saúde em alertar os grupos de risco em relação à listeriose e quais os alimentos de risco, ainda se verifica que algumas pessoas estão mal informadas (Cardoso, 2016). Um adequado processamento térmico dos alimentos, uma correta armazenagem de produtos refrigerados ($<4^{\circ}\text{C}$), uma limpeza regular dos frigoríficos, boas práticas de preparação de alimentos de forma a evitar contaminações cruzadas e o consumo de alimentos prontos a consumir o mais rapidamente possível são algumas recomendações que devem ser fornecidas. (Pita, 2012).

2.1.2. Produtos alimentares associados à listeriose

Os produtos prontos a consumir (RTE, *ready to eat*) são, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005 e respetivas alterações, alimentos destinados pelo produtor ou fabricante ao consumo humano direto, sem necessidade de cozedura ou outra transformação, eficazes para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos. Estes produtos são conservados a temperaturas de refrigeração, permitindo assim que a bactéria *Listeria monocytogenes* se multiplique no alimento (McLauchlin, 1996).

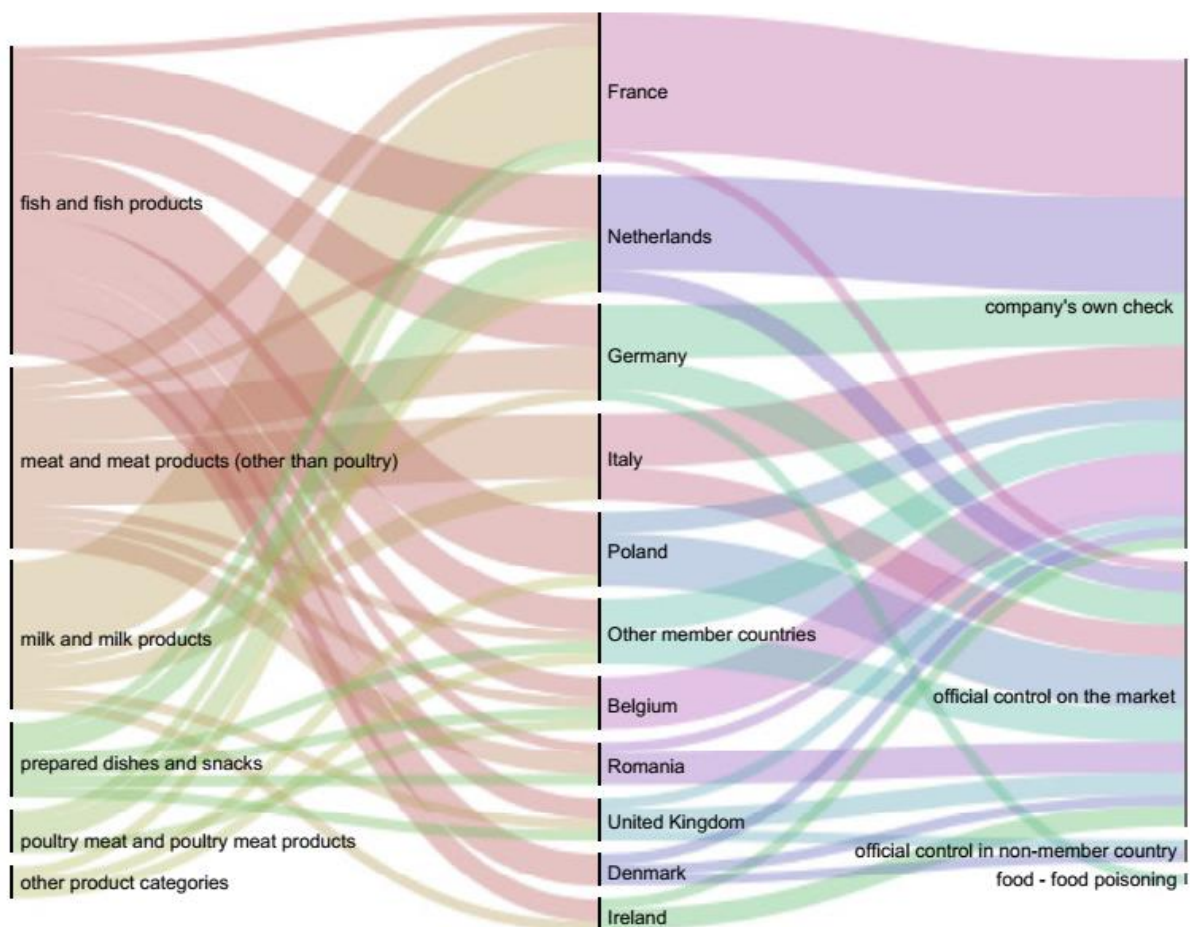
A refrigeração é muitas vezes utilizada como meio de controlar ou diminuir a multiplicação de microrganismos patogénicos nos alimentos e o facto de a bactéria *Listeria monocytogenes* sobreviver e multiplicar-se nestas temperaturas, torna-se um desafio para a indústria alimentar.

A bactéria *Listeria monocytogenes* tem estado associada especificamente a certos produtos na Europa, tal como consta no sistema de notificação rápida para alimentos e alimentos para animais (RASFF - *The Rapid Alert System for Food and Feed*) da União Europeia: peixe fumado produzido na Polónia (27 notificações em 2014, 20 em 2015), queijos provenientes de França (11 notificações em 2014, 18 em 2015) e de Itália (10 notificações em 2014, 6 em 2015) (European Commission, 2015, 2016, 2017).

De acordo com o relatório de atividades de monitorização de zoonoses (EFSA & ECDC, 2017) e com os relatórios do RASFF (European Commission, 2017), a presença de *Listeria monocytogenes* foi relatada nos seguintes produtos prontos a consumir: leite e produtos derivados, carnes e produtos derivados, peixe e produtos derivados, saladas, produtos de pastelaria e padaria, óleos e gorduras, vegetais e frutas.

Em 2016, foram notificados na Europa, através da RASFF os produtos alimentares descritos na Figura 1, com as seguintes origens de notificação e países de produção (European Commission, 2017).

Figura 1 - Diagrama de Sankey- Notificações por presença de *Listeria monocytogenes* através do sistema RASFF nos diferentes tipos de produtos alimentares, com as diferentes origens de notificação e países de produção (European Commission, 2017).



Legenda: *fish and fish products* – peixe e produtos à base de peixe; *meat and meat products (other than poultry)*- carne e produtos à base de carne exceto carne de aves; *milk and milk products*- leite e laticínios; *prepared dishes and snacks*- refeições prontas a consumir e *snacks*; *poultry meat and poultry meat products*- produtos de carne de aves ou à base de carne de aves; *other product categories* – outros produtos alimentares; *company's own check*- análises de controlo efetuadas pela empresa que produz os produtos; *official control on the market* – controlo oficial no mercado por parte de autoridades competentes; *official control in non-member country*- controlo oficial no mercado por parte de entidades regulamentares ou autoridades competentes de países que não são membros da União Europeia; *food poisoning* – surto de listeriose em vários países.

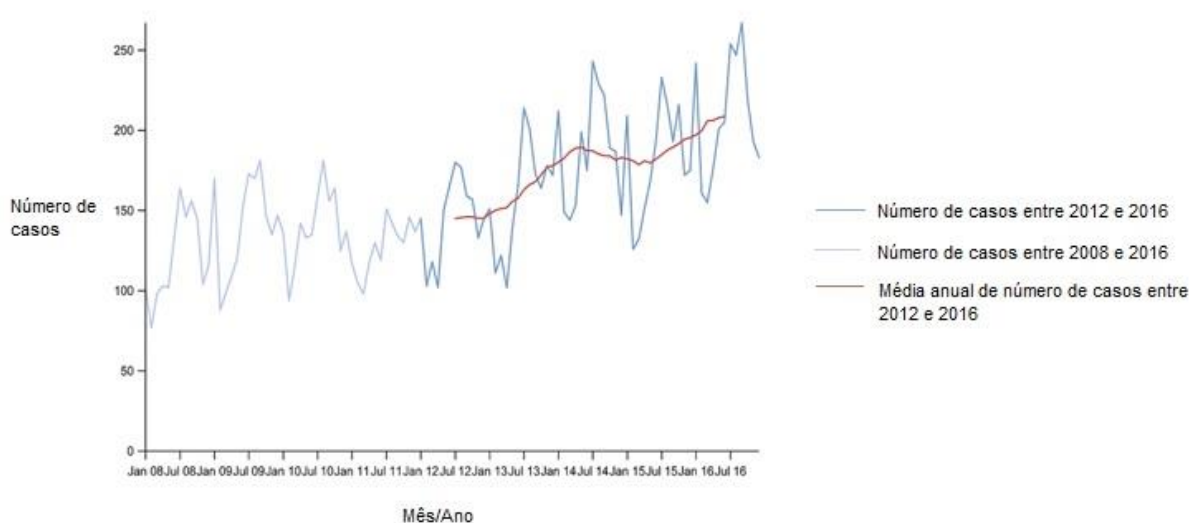
Em Portugal, foi estudada a prevalência de *Listeria monocytogenes* em diversos produtos comercializados, recolhidos ao nível do retalho e da indústria sendo que, os géneros alimentícios crus que apresentaram maiores taxas de não conformidade foram a carne de frango crua (60%), farinha (18,5%), carne vermelha crua (17,7%), leite cru (16,7%), vegetais congelados (12,9%) e peixe cru (12%). No entanto, a presença de *Listeria monocytogenes* é ainda mais alarmante em produtos prontos a consumir, sendo que os géneros alimentícios que registaram uma maior prevalência foram o fiambre (25%), frutos secos (8,3%), produtos de pastelaria (4,1%) e queijo fresco (4%) (Mena et al., 2004).

A ASAE é responsável pelo Plano Nacional de Colheita de Amostras (PNCA), que é um plano orientado para a monitorização dos géneros alimentícios que se encontram à disposição do consumidor final e os seus resultados foram analisados por Reis, Costa, e Teixeira (2015) sendo que, ao longo de 6 anos (2009 a 2014) foi possível verificar que os grupos de géneros alimentícios mais associados ao aparecimento de *Listeria monocytogenes* em Portugal foram: “Alimentos prontos para consumo”; “Carnes”; “Leite e derivados”.

2.1.3. Casos de listeriose na Europa e no Mundo

Só no ano de 2016 foram reportados, por 28 estados membros da União Europeia, 2536 casos de listeriose humana (EFSA & ECDC, 2017). A taxa de notificação é 0.47 casos por 100 000 pessoas. A maior parte dos casos com origem conhecida foram reportados como adquiridos na UE (>99%) e não associados a viagens para fora da UE. Existe uma tendência crescente estatisticamente significativa nos últimos nove anos, assim como no período mais recente (2012 a 2016), sendo que, a listeriose tem um padrão sazonal, muito associada aos meses de maior calor (Verão/Outono), tal como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Tendência de casos humanos confirmados de listeriose na Europa entre 2008 e 2016 (adaptado de EFSA & ECDC, 2017).



A informação de hospitalização foi fornecida em apenas 38,8% dos casos em 2016, sendo reportado que 97,7% desses casos foram hospitalizados. O desfecho de 1524 casos (60,1%) foi reportado, sendo que, ocorreram 247 mortes devido a listeriose em 2016 na Europa. A taxa de letalidade no ano de 2016 em casos em que se conheceu o desfecho foi de 16,2%. Tem vindo a ser registado um ligeiro aumento no número de mortes nos últimos anos em comparação com 2008 (187 mortes). França reportou o maior número de casos fatais, seguida pela Alemanha (EFSA & ECDC, 2017).

Existem diversos exemplos de surtos de listeriose nos últimos anos no mundo, que vieram a público e foram bastante mediáticos:

- Surto em Portugal, entre 2009 e 2011 na região de Lisboa e Vale do Tejo. Foram descritos 51 casos de listeriose entre março de 2009 a janeiro de 2012, dos quais 25 casos foram confirmados, identificou-se uma única estirpe (estirpe I, serotipo 4b e pulsotipo 070 e 0101). A investigação do surto concluiu que a sua etiologia foi em queijo contaminado com *Listeria monocytogenes*, tendo falecido 8 pessoas. (Lopes, 2013);
- Surto na Áustria, na Alemanha e na República Checa em 2009 e 2010, pelo consumo de queijo. Registaram-se 34 casos de listeriose invasiva (com sintomas a nível do sistema nervoso), levando a 8 mortes (Fretz, 2010).
- Surto nos EUA (Louisiana) entre janeiro e junho de 2010, atribuído ao consumo de queijo, sendo que, foram reportados 14 casos confirmados de listeriose invasiva e ocorreram 2 mortes (CDC, 2011a).
- Surto de grandes dimensões nos EUA em 2011, que afetou 146 pessoas e vitimou mortalmente 25. Este surto deveu-se à contaminação de meloas com *Listeria monocytogenes*, numa quinta no estado de Colorado (CDC, 2011b).
- Surto na Dinamarca no final de junho de 2014, através do consumo de um preparado enrolado de carne com 20 pessoas doentes e 12 mortes. Foram realizadas retiradas de produto do mercado na Alemanha, Noruega, Suécia e Dinamarca (European Commission, 2015).
- Surto nos EUA entre 2014 e 2015, devido ao consumo de maçãs caramelizadas. Foram afetadas 35 pessoas, sendo que 34 foram hospitalizadas. 11 dessas pessoas tiveram a forma materno fetal/neonatal, sendo que se registou uma morte fetal devido a listeriose (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson & Whiting, 2017).
- Surto na África do Sul, sendo o surto de listeriose com maiores dimensões alguma vez registado. A 4 de Março de 2018 estavam confirmados laboratorialmente 948 casos de listeriose e já tinham ocorrido 180 mortes, desde 1 de janeiro de 2017. A taxa de letalidade registada é de 27%. Foram entrevistadas 109 pessoas com listeriose confirmada sendo que 85% reportaram terem consumido produtos cárneos prontos a consumir. O produto *polony sausage*, uma salsicha de carne de porco e carne de vaca fumada, foi o produto alimentar mais reportado. Após 9 crianças de uma creche terem ficado doentes no início de janeiro de 2018, com sintomas gastrointestinais e terem dado entrada no hospital, onde foi confirmada listeriose, foi realizada uma visita à creche e foram recolhidas amostras do produto *polony sausage*. As amostras deste produto eram positivas e os produtos produzidos pela *Enterprise Foods* tinham o mesmo tipo de sequência que 91% dos isolados em pacientes com listeriose. Após a visita às instalações *Enterprise Foods* foi confirmado que este seria a origem do surto de listeriose que estava a decorrer há mais de um ano. Foi recomendado que toda a

população evite o consumo de produtos prontos a consumir carnes devido ao risco de contaminação cruzada, principalmente os grupos de risco (Motsoaledi, 2018).

3. *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* foi descoberta por Murray, Webb e Sawnn em 1924, quando resolveram estudar uma epidemia que afetava coelhos e porquinhos da Índia no seu laboratório em Cambridge. A bactéria foi inicialmente nomeada como *Bacterium monocytogenes* porque provocava monocitose (Magalhães *et al.*, 2014). Foram observados seis casos de morte súbita em coelhos jovens com lesões semelhantes entre si, o que despertou a curiosidade de cientistas (Pita, 2012). O médico Harvey Pirie isolou o mesmo microrganismo nomeando-o de *Listerella hepatolytica*, em honra do cirurgião britânico Lord Joseph Lister, que descobriu a bactéria em feridas e propôs o uso de antissépticos para desinfecção de instrumentos e mãos dos cirurgiões e mesmo de feridas (Pirie, 1927; Pita, 2012; Magalhães *et al.*, 2014).

Quando as duas espécies foram identificadas como sendo a mesma, os investigadores Murray e Pirie decidiram nomear o agente de *Listerella monocytogenes*, mas este nome não foi aceite pelo Comité de Bacteriologia Sistemática por já haver registos anteriores associados ao nome *Listerella*. Até 1940 houve alguma confusão relativamente à nomenclatura da bactéria sendo que, nesse ano, Pirie propôs o nome de *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940). O primeiro caso reportado de listeriose humana ocorreu na Dinamarca em 1929, no entanto, a bactéria preservada em laboratório mais antiga é datada de 1921, isolada de um paciente com meningite em França por Dumont e Cotoni (Magalhães *et al.*, 2014). Em 1983, a bactéria *Listeria monocytogenes* é considerada como um novo agente patogénico associado ao consumo de alimentos contaminados devido a vários casos reportados globalmente (Magalhães *et al.*, 2014; Iranzo *et al.*, 2015).

A posição filogenética não foi clara desde o início sendo que, a bactéria *Listeria monocytogenes* estava inicialmente incluída na família *Corinebacteriaceae*, de seguida foi um género com afiliação incerta e finalmente foi incluído na secção de “bacilos Gram-positivos não esporulados” (Rocourt & Buchrieser, 2007). As novas técnicas moleculares e genéticas ajudaram a esclarecer a posição filogenética do género *Listeria*.

Assim, atualmente, a bactéria *Listeria monocytogenes* apresenta a seguinte classificação taxonómica:

Reino – *Bacteria*

Filo - *Firmicutes*

Classe- *Bacilli*

Ordem – *Bacillales*

Família – *Listeriaceae*

Gênero – *Listeria*

Espécies - *Listeria monocytogenes*

Listeria grayi

Listeria innocua

Listeria welshimeri

Listeria ivanovii

Listeria seeligeri

Listeria rocourtiae

Listeria marthii

Listeria fleischmannii

Listeria weihenstephanensis

Listeria floridensis

Listeria aquatica

Listeria cornellensis

Listeria riparia

Listeria grandensis

Listeria booriae

Listeria newyorkensis

Listeria costaricensis

A bactéria *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram positiva, catalase positiva, oxidase negativa, é um bacilo pequeno (0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento) e móvel a 25°C sendo que os seus flagelos são inanimados a 37°C, não ramificada e anaeróbia facultativa (Magalhães *et al.*, 2014). A bactéria *Listeria monocytogenes* é xilose negativa, ramnose positiva, hemólise positiva e apresenta uma reação hemolítica contra *Staphylococcus aureus* (Beaufort, 2011).

O gênero *Listeria* inclui neste momento 18 espécies: *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940), *Listeria grayi* (Larsen & Seeliger, 1966), *Listeria innocua* (Seeliger, 1981), *Listeria welshimeri* (Rocourt & Grimont, 1983), *Listeria seeligeri* (Rocourt & Grimont, 1983), *Listeria ivanovii* (Seeliger, Rocourt, Schrettenbrunner, Grimont & Jones, 1984), *Listeria monocytogenes marthii* (Graves *et al.*, 2010), *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010), *Listeria fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013), *Listeria weihenstephanensis* (Lang Halter, Neuhaus & Scherer, 2013), e as espécies mais recentes *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria*

riparia e *Listeria grandensis* (Den Bakker *et al.*, 2014), *Listeria booriae* e *Listeria newyorkensis* (Weller, Andrus, Wiedmann & Den Bakker, 2015) e *Listeria costaricensis* (Nunez-Montero *et al.*, 2018).

Apesar da bactéria *Listeria monocytogenes* ser o agente patogénico reconhecido da listeriose em humanos, já foram reportados casos raros de infeção por *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (Magalhães *et al.*, 2014).

Atendendo à presença de antígenos O (somáticos) e H (flagelar), são reconhecidos 13 serotipos na bactéria *Listeria monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (Magalhães *et al.*, 2014). Embora a listeriose possa ser causada por qualquer um dos serotipos de *Listeria monocytogenes*, os serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b são identificados em quase 95% dos casos de listeriose (Doumith, Buchrieser, Glaser, Jacquet, & Martin, 2004).

O serotipo 4b é isolado frequentemente em surtos de listeriose humana, enquanto que os serotipos 1/2a e 1/2b são associados a casos esporádicos. Nos animais, em casos de encefalite ovina, os isolados de *Listeria monocytogenes* encontrados são normalmente do serotipo 1/2b ou 4b e os casos de septicémia e aborto são predominantemente do serotipo 1/2a (Liu, 2006).

A bactéria consegue multiplicar-se entre os -1,5°C e os 45°C, sendo esta uma das características que mais lhe confere importância na indústria alimentar e apresenta um desenvolvimento ótimo entre 30°C e 37°C (European Commission & Directorate General for Health and Consumer Affairs [CE/DG SANCO], 2008). Dado que se multiplica a estas temperaturas, todos os produtos que são armazenados à temperatura de refrigeração são suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* se não existirem outros fatores limitativos.

Existem outros fatores que influenciam a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, como o pH e a atividade da água (a_w), como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Fatores que influenciam a multiplicação e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* (adaptado de CE/DG SANCO, 2008).

Fator	Consegue desenvolver-se			Consegue sobreviver (mas não se multiplica)
	Limite mínimo de multiplicação	Valores ótimos (máximo de multiplicação)	Limite máximo de multiplicação	
Temperatura (°C)	-1,5 a +3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
a _w	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentração de sal (%)	<0,5	0,7	12-16	≥20
Atmosfera	Anaeróbio facultativo (pode crescer na presença ou ausência de oxigênio, isto é, em vácuo ou atmosfera modificada)			
Tratamento térmico durante o processamento de alimentos	A combinação tempo/temperatura de 70°C durante 2 minutos é suficiente para uma redução de 6 logaritmos de base 10 na concentração de <i>Listeria monocytogenes</i> . Existem outras combinações tempo/temperatura que podem também ser eficazes.			

Em relação ao pH, *Listeria monocytogenes* multiplica-se num grande leque de valores de pH, entre 4,2 a 9,5, com um desenvolvimento ótimo a pH de 7 (CE/DG SANCO, 2008). No entanto, estes valores podem variar consoante o tipo de ácido e as temperaturas de armazenamento. Num estudo realizado, quando inoculada em laranjas (com pH entre os 3,6 e 3,8), foram observadas reduções logarítmicas na ordem dos 0,5 a 1 ufc/g durante o armazenamento a 4°C durante 7 dias. No entanto, foram observadas reduções logarítmicas de 4 a 5 ufc/g quando as laranjas foram armazenadas a 30°C durante 2 a 5 dias (Magalhães *et al.*, 2014). Em condições ótimas de temperatura e pH, o mínimo de a_w que permite a multiplicação de *Listeria monocytogenes* é 0,90 (CE/DG SANCO, 2008). No entanto, num estudo realizado, a bactéria *Listeria monocytogenes* sobreviveu durante 12 semanas num produto pronto a consumir de carne com a_w entre 0,79 e 0,86 armazenado a 5°C (Magalhães *et al.*, 2014). A bactéria *Listeria monocytogenes* consegue sobreviver até 20% de concentração de sal (CE/DG SANCO, 2008).

A multiplicação de *Listeria monocytogenes* acontece em condições aeróbias, mas é otimizada em condições anaeróbias, verificando-se multiplicação em embalagens com atmosfera protetora e em produtos embalados a vácuo. No entanto, verificou-se que concentrações de CO₂ de mais de 50% são inibitórias (Magalhães *et al.*, 2014; Iranzo *et al.*, 2015).

Trata-se de uma bactéria ubiquitária na natureza, que pode multiplicar-se em ambientes húmidos, forma nichos e biofilmes nas instalações e equipamentos que são difíceis de eliminar durante a limpeza e desinfecção, resiste a altas concentrações de sal, é capaz de multiplicar-se a um pH abaixo de 4,5 e como é uma bactéria anaeróbia facultativa, pode sobreviver em produtos embalados a vácuo ou atmosfera protetora. É capaz de se multiplicar a temperaturas de refrigeração e sobreviver a temperaturas de congelação, porque permanece metabolicamente ativa abaixo de 0°C (Magalhães *et al.*, 2014; Iranzo *et al.*, 2015).

Na indústria alimentar, a sua presença nas matérias-primas não pode ser totalmente evitada, devido ao facto de ser uma bactéria ubiquitária, pelo que, é essencial implementar medidas de boas práticas de higiene e de laboração de modo a prevenir a contaminação cruzada de alimentos já processados e prontos a consumir.

Os possíveis vetores de contaminação cruzada por *Listeria monocytogenes* numa indústria alimentar são numerosos, sendo que, podemos pensar no calçado e roupas dos trabalhadores, veículos de transporte, animais ou pragas, matérias-primas e outros ingredientes e até mesmo trabalhadores portadores da bactéria. Em indústrias alimentares, é também frequente existirem zonas com muita humidade e com condensação, favorecendo a multiplicação desta bactéria. A bactéria *Listeria monocytogenes* é capaz de aderir a diferentes superfícies (poliéster, aço inoxidável, vidro, entre outros), sendo a presença de biofilmes frequente (Iranzo *et al.*, 2015).

Existem diversos exemplos de locais de uma instalação que, ao não serem corretamente higienizados, podem causar contaminações cruzadas por *Listeria monocytogenes*:

- Água estagnada, que pode ser um possível reservatório;
- Utensílios de limpeza, de trabalho, de produção, de proteção, de manutenção, que são frequentemente uma fonte de contaminação;
- Áreas/equipamentos de refrigeração ou extração que se encontrem elevados ou mesmo presos ao teto, podem ser uma fonte de contaminação, quando gotejam para cima de áreas onde os produtos estão a ser processados e produzidos.

Diversos estudos indicam que a fonte mais importante de contaminação cruzada dos alimentos por *Listeria monocytogenes* na indústria alimentar são exatamente os equipamentos e as superfícies de contato (Magalhães *et al.*, 2014).

Segundo Henriques e Fraqueza (2017), esta bactéria está frequentemente associada à indústria de produtos prontos a consumir à base de carne, como já referido, sendo a presença de biofilmes considerada a maior fonte de recontaminação destes produtos e a presença da bactéria está associada ao processamento, como cortar, fatiar, triturar e embalar, de produtos após o tratamento listericida.

4. Controlo de *Listeria monocytogenes* na indústria alimentar

A ubiquidade da bactéria *Listeria monocytogenes*, com capacidade de se multiplicar lentamente a temperaturas de refrigeração e causando elevadas taxas de letalidade no homem que consome alimentos são fatores que levam ao interesse e à preocupação quer das indústrias alimentares, quer das autoridades competentes, sobre este agente patogénico e no seu controlo. A estratégia de controlo desta bactéria nas indústrias concentra-se em prevenir a persistência da bactéria nas instalações e equipamentos, através de biofilmes, impedindo-a de alcançar os alimentos, em especial os prontos a consumir (RTE) (Iranzo *et al.*, 2015).

Para além do controlo da bactéria através de um programa de pré-requisitos (em específico, a higienização das instalações e do pessoal e as medidas de prevenção da contaminação cruzada) bem implementado e um plano HACCP bem estabelecido, as indústrias alimentares que produzem produtos prontos a consumir são, neste momento, obrigadas a realizar um programa de análises anuais especificamente direcionados ao controlo da bactéria *Listeria monocytogenes*, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005.

Segundo a Organização Mundial de Saúde e a Organização dos Alimentos e Agricultura (WHO/FAO, 2004), os alimentos prontos a consumir são alimentos que são consumidos sem qualquer tratamento térmico ou outro tratamento antes do consumo, sem preparação adicional. É um alimento a ser consumido tal como se apresenta para venda ao consumidor, sem existir tratamento listericida. Outra definição semelhante é estabelecida no Regulamento (CE) nº 2073/2005, que os define como “alimentos destinados ao consumo humano, sem a necessidade de os cozinhar, nem de outro tipo de transformação ou tratamento eficaz para eliminar ou reduzir para um nível aceitável os microrganismos perigosos”.

O risco ligado ao consumo de produtos alimentares contaminados por *Listeria monocytogenes* está relacionado com a presença e número de bactérias no alimento, possibilidade da sua multiplicação em função das características físico-químicas do alimento, da temperatura e da duração do período de conservação ou armazenamento (Fraqueza *et al.*, 2006).

As medidas usadas para controlar a presença de *Listeria monocytogenes* nas instalações e produtos numa indústria alimentar envolvem a deteção do agente patogénico através de análises laboratoriais com uma frequência definida, boas práticas de higiene das superfícies em contacto com produtos alimentares, boas práticas de fabrico ou laboração, prevenção de contaminações e eliminação de contaminações existentes (Henriques & Fraqueza, 2017; Henriques, Gama, & Fraqueza, 2014; Iranzo *et al.*, 2015). Neste último ponto, desempenham um papel fundamental as operações realizadas para a limpeza e desinfeção das instalações, assim como a implementação de protocolos específicos para a eliminação de biofilmes nas superfícies (Henriques & Fraqueza, 2017).

As análises laboratoriais para a deteção de *Listeria monocytogenes* nos alimentos, incluindo produtos acabados e matérias-primas, permitem verificar se as estratégias de controlo que

estão a ser aplicadas são eficazes e são um recurso muito importante no sentido de evitar a comercialização de produtos não seguros para consumo.

Um dos protocolos que pode ser útil para melhorar a compreensão do comportamento de *Listeria monocytogenes* numa unidade industrial inclui a aplicação de uma subtipagem molecular, como a eletroforese em campos pulsáteis (*pulsed-field gel electrophoresis* [PFGE]) nos isolados de *Listeria monocytogenes* de diferentes fontes (produto acabado, matéria-prima, sala de embalamento, sala de cozedura/processamento térmico, sala de preparação, manipuladores de diferentes secções, entre outros) no sentido de se verificar quais as fontes de contaminação na cadeia de produção, as rotas de transferência dentro da própria instalação e quais as estirpes persistentes (presença de biofilmes) que colonizam e provavelmente recontaminam a unidade ao longo do tempo (Fox, Wall, & Fanning, 2015).

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* é efetuada também rotineiramente, em superfícies de contato na indústria alimentar, verificando-se assim se o protocolo de higienização das superfícies está a ser eficaz. Nesta amostragem são escolhidas sempre superfícies com maior probabilidade de conter este agente patogénico, como por exemplo, lâminas de uma máquina fatiadora.

Como principais fontes de contaminação podemos pensar em:

- **Matérias-primas e ingredientes:** que podem chegar à indústria já contaminados com *Listeria monocytogenes*. Assim, na produção do alimento são contaminadas as superfícies por onde passa a matéria-prima, o produto na qual esta matéria-prima irá ser incorporada e os operadores que manipulam essa matéria-prima. Para controlar esta via de contaminação, as indústrias alimentares devem exercer um controlo efetivo de fornecedores, de forma a assegurar que as matérias-primas e ingredientes são seguros para serem incorporados nos seus produtos e um controlo interno de boas práticas de higiene e laboração. Como já foi referido, as matérias-primas devem também ser incluídas no plano analítico, de forma a detetar a sua contaminação.
- **Ambiente:** o ar e o pó em suspensão constituem uma via de contaminação, uma vez que, podem-se depositar sobre os alimentos durante o processo de produção. Portanto, as salas e os locais onde se elaboram alimentos devem estar sempre em bom estado de conservação e de higiene, impedindo a proliferação de microrganismos e criação de biofilmes. Deve-se evitar a entrada de ar exterior em zonas de laboração, especialmente em zonas “limpas”, ou seja, em zonas onde se manuseia produto acabado, de forma a minimizar a contaminação pelo ambiente. Tal, consegue-se com a utilização de pressões de ar positivas, para que o ar da zona “limpa” seja forçado a sair para a zona “suja”, ou zona onde se manipula a matéria-prima ou produtos crus, e não o contrário. Deve existir também, e sempre que possível, uma separação física entre as zonas “sujas” e as zonas “limpas”.

- Contaminação cruzada direta: quando os alimentos contaminados contaminam por contato direto os alimentos não contaminados, por exemplo, quando um produto alimentar cru entra em contacto com um produto já processado termicamente. Para evitar esta contaminação deve-se criar zonas ou áreas de trabalho separadas e deve-se respeitar os fluxos de circulação dos alimentos definidos, de modo a não ocorrerem contaminações.
- Contaminação cruzada indireta: é produzida pela transferência de microrganismos aos alimentos pela contaminação de superfícies de contacto, como por exemplo, mesas, facas ou outros utensílios de trabalho, tapetes, utensílios de limpeza ou de manutenção, equipamentos de corte, trabalhadores (mãos, fardamento), entre outros. A prevenção desta contaminação consegue-se através da implementação de boas práticas de higiene e de laboração e com um programa de limpeza e desinfeção eficaz. Os diferentes tipos de zonas devem isolar-se entre si e ter regras específicas para a higiene pessoal, para o vestuário e para os processos de limpeza e desinfeção. Em muitas indústrias alimentares, muito devido aos referenciais normativos de certificação do sistema de gestão da segurança dos alimentos, implementou-se a criação de zonas de alto risco (ou *high-risk*), sendo estas zonas “separadas” e isoladas, com regras próprias, com fardamento, utensílios e trabalhadores próprios.

A presença de *Listeria monocytogenes* no produto final tem a sua origem, em grande parte, na matéria-prima que é utilizada (Iranzo *et al.*, 2015).

Algumas medidas de prevenção da contaminação cruzada dos produtos prontos a consumir já são atualmente utilizadas, como: separação de áreas de produção, separação de trabalhadores de forma a que estes não sejam veículos de contaminação cruzada, utilização de um fardamento diferente, higienizações intermédias de áreas sensíveis, controlo analítico das superfícies de contacto, entre outros. Atualmente, para além destas medidas que são mais estruturais e de procedimentos internos de boas práticas, existem também medidas de proteção que podem ser utilizadas nos produtos produzidos, de forma a que a multiplicação deste agente patogénico nos produtos seja de forma controlada e minimizada. Estas barreiras à multiplicação de *Listeria monocytogenes* podem ser conseguidas por um controlo da composição e propriedades dos alimentos, assim como, dos processos utilizados para a transformação e conservação destes (Iranzo *et al.*, 2015). Como exemplos destas barreiras temos a utilização de temperaturas elevadas (processos de pasteurização ou esterilização), o uso de aditivos, o uso de atmosferas protetoras com temperaturas baixas, entre outros. Todas estas medidas visam garantir a estabilidade e a segurança dos alimentos, assim como a qualidade nutricional e a viabilidade económica dos mesmos. É a combinação de variadas

barreiras que permite e facilita o controlo da contaminação microbiológica por agentes patogénicos.

As possíveis barreiras para o controlo de *Listeria monocytogenes* podem classificar-se em três grupos, dependendo da natureza dos elementos envolvidos. Assim, existem barreiras físicas, associadas ao processamento de alimentos e que implicam a utilização de energia e materiais para a conservação de alimentos; barreiras físico-químicas, que se baseiam no uso de substâncias químicas e barreiras microbiológicas que se baseiam no uso de culturas de proteção ou outros métodos, criando meios hostis para a multiplicação de agentes patogénicos (Iranzo *et al.*, 2015).

Segundo Iranzo *et al.* (2015), como exemplo destas barreiras, temos:

- Tratamento térmico: submeter os alimentos a temperaturas altas durante tempo suficiente é um método de eliminar ou reduzir a contaminação por *Listeria monocytogenes*. Considera-se que a uma temperatura interna de 70 °C durante 2 minutos se consegue obter uma redução de 6 log (redução 6D) de células viáveis de *Listeria monocytogenes* (CE/DG SANCO, 2008). É importante que o binómio temperatura-tempo esteja validado nas indústrias alimentares, de forma a que esteja testado e comprovado que o método/barreira física utilizado é capaz de destruir ou reduzir até níveis seguros o número de células viáveis deste agente patogénico. A *Food Safety Authority of Ireland* (FSAI, 2006) apresenta alguns binómios de tempo e temperatura que são capazes de conseguir uma redução 6D de *Listeria monocytogenes*. Como exemplos temos: temperatura de 72°C durante 1 minuto e 5 segundos e temperatura de 68°C durante 3 minutos e 42 segundos.
- Irradiação dos alimentos: o uso de micro-ondas também é eficaz na redução ou eliminação deste patogénico. O problema deste método é a falta de uniformidade de temperaturas em diferentes zonas do alimento, sendo que, se não atingir temperaturas elevadas em certas zonas do alimento não é conseguido o devido efeito listericida no alimento. Atualmente são comercializados diferentes modelos de micro-ondas, com diferentes potências sendo que, este método/barreira poderá não ser totalmente eficaz, dependendo do tipo e da eficácia do micro-ondas utilizado. O consumidor deve sempre seguir as indicações do fabricante, tendo em atenção sempre o bom estado de funcionamento do seu micro-ondas.
- Embalamento em atmosfera protetora: é uma técnica habitualmente utilizada para produtos transformados de carne (por exemplo no presunto e fiambre). O efeito da atmosfera protetora é a remoção de ar atmosférico e introdução na embalagem de uma mistura de gases, como o dióxido de carbono e o azoto. Esta atmosfera modificada, juntamente com a refrigeração e as boas práticas de higiene, é capaz de reduzir a probabilidade de multiplicação dos microrganismos, não alterando as propriedades organoléticas do produto e permitindo prolongar a vida útil do produto.

No entanto, a bactéria *Listeria monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, ou seja, consegue multiplicar-se tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Em produtos prontos a comer com atmosfera modificada ou vácuo, a bactéria *Listeria monocytogenes* consegue multiplicar-se, mas, com elevadas concentrações de dióxido de carbono nas embalagens, existe inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Tal como já referido, a utilização de embalagens de atmosfera modificada é utilizada em conjunto com outras barreiras, como a refrigeração ou incorporação de conservantes, para assegurar a segurança do alimento.

- Aditivos alimentares: uma das maneiras de prevenir a multiplicação de agentes patogénicos envolve a modificação da composição dos alimentos, com a utilização de aditivos alimentares que, sem modificarem significativamente as propriedades dos alimentos, criam condições hostis para a multiplicação. O Regulamento (CE) nº 1333/2008 regulamenta a utilização de aditivos alimentares na União Europeia. Entre as aplicações de aditivos alimentares, podemos pensar por exemplo nos conservantes, que prolongam o tempo de vida útil dos alimentos, impedindo a deterioração bacteriana.

- Culturas protetoras ou probióticos: a utilização de culturas de microrganismos que são inertes e produzem substâncias que impedem a proliferação e multiplicação de microrganismos patogénicos, é cada vez mais utilizada pelas indústrias alimentares. Esta introdução de culturas não deve alterar significativamente as propriedades dos alimentos, como o seu aspeto ou sabor, apenas produzindo substâncias que inibem a multiplicação de microrganismos patogénicos. Como exemplo da utilização de culturas protetoras ou probióticos em produtos alimentares, temos as bactérias do género *Lactobacillus spp.* com a produção de ácido láctico, o que pode ser efetivamente eficaz na prevenção de multiplicação de *Listeria monocytogenes* (Bredholt, Nesbakken, & Holck, 2001; Vermeiren, Devlieghere, Vandekinderen, & Debevere, 2006; Maragkoudakis *et al.*, 2009; Sakaridis *et al.*, 2012). A inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* pode ocorrer devido a um mecanismo ou o sinergismo de vários: competição por nutrientes, redução do pH, produção de ácido láctico, ácido acético ou peróxido de hidrogénio e outras substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas. A utilização destas substâncias antimicrobianas já foi tão estudada e verifica-se a sua eficácia com efeito inibitório em diversos agentes patogénicos, que já estão a ser produzidos produtos desinfetantes com ácido láctico na sua composição, como por exemplo o biocida “BacAcid EI 1000”, da Ecolab (DGAV, 2017).

- Fumados: a utilização do fumeiro pode ser eficaz na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes*. O efeito protetor do fumo deve-se à presença de compostos fenólicos e outros antimicrobianos que impregnam os alimentos. A

fumagem pode ser utilizada tanto a quente como a frio, sendo que, no primeiro caso, a ação protetora do fumo tem um efeito sinérgico com as temperaturas altas. Alguns produtos prontos a consumir utilizam o processo de fumagem que combina a secagem com a adição de fumo líquido, que confere aos alimentos o aroma típico dos produtos fumados.

De acordo com os procedimentos HACCP (Hazard analysis and critical control points), a segurança dos alimentos deve ser controlada pela monitorização de pontos críticos de controlo específicos através de parâmetros intrínsecos e extrínsecos aos produtos, como o binómio tempo/temperatura, a_w e pH. Na indústria alimentar, usa-se o controlo destes parâmetros físico-químicos (tempo/temperatura, pH e a_w) que são mais fáceis e menos dispendiosos de monitorizar diariamente comparando com a monitorização de critérios microbiológicos (CE/DG SANCO, 2008). O controlo da contaminação inicial dos ingredientes e dos produtos crus, os procedimentos HACCP, assim como implementação das boas práticas de higiene são fatores que irão influenciar a presença e capacidade de multiplicação desta bactéria nos produtos (CE/DG SANCO, 2008; Beaufort, Cornu, Bergis, Lardeux, & Lombard, 2014).

Nas carnes de aves cruas é comum ser detetada *Listeria spp.*, estando habitualmente presente no ambiente fabril. Em Portugal, estudos de frequência do género *Listeria* apresentam resultados que variam entre 30 a 100% em carnes de aves e prevalência da espécie *Listeria monocytogenes* entre 12 a 60% (Fraqueza *et al.*, 2006). A presença deste patogénico na carne crua não é tão preocupante devido ao facto de a carne crua ser sujeita a preparação culinária com tratamento térmico listericida antes de ser consumida, contudo não pode ser descartada a importância de produtos crus muito contaminados como fonte de uma contaminação cruzada com produtos já prontos a consumir, o que, muitas vezes acontece na casa dos consumidores menos sensibilizados para este aspeto.

Num estudo desenvolvido em dez indústrias da carne em Portugal por Henriques *et al.* (2014), chegou-se à conclusão que quanto melhor a avaliação numa auditoria de verificação de boas práticas de higiene e da laboração, maior probabilidade existe em ser detetada bactéria *Listeria monocytogenes* no ambiente e nos produtos alimentares. Os autores referem que, apesar da aparente contradição, tal evidência parece resultar de uma prévia identificação da bactéria, sem uma adequada análise de causas, não permitindo que a verdadeira fonte de contaminação por *Listeria monocytogenes* na unidade de produção seja identificada, perpetuando a sua presença nessas instalações. É reforçado ainda a importância da realização de um diagnóstico conjunto, baseado em evidências de auditoria e avaliação microbiológica quando é realizada uma auditoria de certificação, o que proporciona uma visão mais fidedigna do sistema de gestão da segurança dos alimentos implementado (Henriques, 2016).

Henriques *et al.* (2014) referem que nas amostras de alimentos, as contagens médias de microrganismos aeróbios totais são significativamente maiores nas indústrias onde *Listeria monocytogenes* é detetada ($5,80 \pm 0,65 \log \text{ ufc/g}$) quando comparado com unidade de produção onde a bactéria não foi detetada ($3,72 \pm 0,53 \log \text{ ufc/g}$). Em relação às superfícies em uso, as contagens de *Enterobacteriaceae* são significativamente maiores quando *Listeria monocytogenes* é isolada ($3,69 \pm 0,38 \log \text{ ufc/g}$) do que quando não o é ($2,03 \pm 0,58 \log \text{ ufc/g}$). Também foi evidente neste estudo, que as contagens de microrganismos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae* no produto foram significativamente inferiores em indústrias que não manipulam o produto após processamento térmico, como já seria de esperar.

Estes resultados suportam o conhecimento geral que as contagens médias de microrganismos aeróbios totais e *Enterobacteriaceae* podem ser usadas como indicadores para a presença de *Listeria monocytogenes* (Henriques *et al.*, 2014).

5. Legislação aplicável

De acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005, o Comité Científico das Medidas Veterinárias Relacionadas com a Saúde Pública (CCMVSP) formulou um parecer a 23 de setembro de 1999 sobre a avaliação dos critérios microbiológicos a aplicar aos produtos alimentares de origem animal para consumo humano. Este comité elaborou também um parecer específico sobre *Listeria monocytogenes*, recomendando que deve ser fixado como objetivo a manutenção de uma concentração de *Listeria monocytogenes* nos géneros alimentícios inferior a 100 ufc/g até ao final do período de vida útil.

No artigo 3º do Regulamento (CE) nº 2073/2005 é referido na alínea 2, que os operadores das empresas do sector alimentar responsáveis pelo fabrico do produto devem realizar estudos, em conformidade com o anexo II do mesmo Regulamento, a fim de verificar se os critérios são cumpridos durante todo o período de vida útil dos produtos. Este requisito é aplicável, sobretudo, aos alimentos prontos a consumir (RTE), suscetíveis de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e que possam constituir um risco para a saúde pública devido à presença desta bactéria (CE/DG SANCO, 2008). No mesmo Regulamento, no artigo 5º é referido, no ponto 2, que deverão ser recolhidas amostras das zonas e do equipamento de produção, ou seja, das superfícies de contacto, com vista à deteção de *Listeria monocytogenes* nas empresas que produzam alimentos prontos para o consumo, suscetíveis de constituir um risco para a saúde pública devido à presença desta bactéria.

Os requisitos específicos relativos à bactéria *Listeria monocytogenes* em produtos prontos a consumir estão descritos no anexo I deste mesmo Regulamento. Este anexo especifica a categoria do alimento, os microrganismos, o plano de amostragem, os limites microbiológicos, os métodos analíticos de referência e a fase de produção em que o critério se aplica. Estes critérios determinam a aceitabilidade e conformidade de um género alimentício colocado no

mercado, sendo que, quando existem resultados não conformes, o alimento deve ser retirado do mercado (ativando-se o procedimento de retirada) e destruído (CE/DG SANCO, 2008).

No anexo II do Regulamento (CE) nº 2073/2005 é descrito que os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir estudos de vida útil, que devem incluir: as características físico-químicas do alimento, as várias etapas de processamento e condições de embalagem e possíveis contaminações, período de vida útil previsto e uma consulta da literatura científica disponível sobre a suscetibilidade de multiplicação e sobrevivência de microrganismos nesse alimento. Quando este estudo não é conclusivo em relação à segurança do alimento, os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir outros estudos adicionais, que podem incluir: modelos matemáticos preditivos estabelecidos para o produto alimentar em questão, utilizando fatores críticos de sobrevivência e multiplicação dos microrganismo no produto; estudos que avaliem a capacidade de multiplicação ou sobrevivência de um microrganismo em questão, que deve estar presente naturalmente no produto durante o seu período de vida útil, em condições razoáveis de armazenamento, distribuição e uso (referidos como testes de durabilidade) e testes que investiguem a suscetibilidade de determinado microrganismo, quando inoculado no alimento, crescer ou sobreviver em condições razoáveis de armazenamento (referidos como testes de desafio). É referido também que estes estudos devem ter em conta a variabilidade inerente ao produto, dos microrganismos em questão e as condições de transformação e armazenagem.

De acordo com o guia desenvolvido pela CE/DG SANCO (2008), para realizar testes de vida útil sobre *Listeria monocytogenes* em produtos prontos a consumir, a primeira etapa a considerar são as características do produto, tanto que, no Regulamento (CE) nº 2073/2005, já estão definidos os produtos prontos a consumir onde a *Listeria monocytogenes* está mais provavelmente ausente ou tem uma multiplicação limitada:

- Alimentos prontos para consumo que tenham recebido um tratamento térmico ou outro tratamento eficaz para eliminar a bactéria *Listeria monocytogenes*, quando não for possível uma recontaminação após este tratamento (por exemplo, produtos tratados termicamente na sua embalagem final);
- Produtos hortícolas e frutas frescos, não cortados e não transformados, excluindo sementes germinadas;
- Pão, bolachas e produtos similares;
- Águas engarrafadas ou embaladas, refrigerantes, cerveja, cidra, vinho, bebidas espirituosas e produtos similares;
- Açúcar, mel e produtos de confeitaria, incluindo produtos de cacau e de chocolate;
- Moluscos bivalves vivos;
- Sal alimentar.

Se o género alimentício se incluir em alguma destas categorias de alimentos, segundo o Regulamento (CE) nº 2073/2005, não será necessário incluir o critério *Listeria monocytogenes* no plano de análises regular, em circunstâncias normais e a segurança dos alimentos é assegurada através do plano de HACCP implementado e boas práticas de fabrico. No caso de serem realizadas análises, estes alimentos incluem-se no ponto 1.3 do capítulo 1, do anexo I do Regulamento (CE) nº 2073/2005, cujo limite é 100 ufc/g para produtos alimentares colocados no mercado durante o período de vida útil, para amostras constituídas por 5 subunidades (n=5).

Se o alimento se destinar a lactentes e/ou tiver fins medicinais, deve-se aplicar os critérios definidos no ponto 1.1 do capítulo 1, do anexo I do Regulamento (CE) nº 2073/2005, isto é, ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g em produtos colocados no mercado durante o período de vida útil, para amostras constituídas por 10 subunidades (n=10).

Ainda assim, se o género alimentício não estiver incluído em nenhuma das categorias acima descritas, mas apresentar as seguintes características:

- Produtos com $\text{pH} \leq 4,4$;
- Produtos com $a_w \leq 0,92$;
- Produtos com $\text{pH} \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$;
- Produtos com data de durabilidade mínima/data limite de consumo de menos de 5 dias;
- Produtos congelados;
- Outros produtos baseados em justificações científicas (como por exemplo, a presença de culturas protetoras), que não permitam a multiplicação de *Listeria monocytogenes*.

Então devem ser aplicados os critérios definidos no ponto 1.3 do capítulo 1, do anexo I do Regulamento (CE) nº 2073/2005, que define o limite de 100 ufc/g em produtos alimentares colocados no mercado durante o período de vida útil, para amostras constituídas por 5 subunidades (n=5).

Se mesmo assim, o alimento não estiver incluído em nenhum dos pontos acima descritos, o alimento pronto a consumir é classificado como suscetível de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* e são assim aplicados os critérios definidos no ponto 1.2 do capítulo 1, do anexo I do Regulamento (CE) nº 2073/2005, isto é, ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu, para amostras constituídas por 5 subunidades (n=5), se o produtor não puder demonstrar, a contento da autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao termo do seu período de vida útil. Se o fabricante puder demonstrar à autoridade competente que o produto não excede o limite de 100 ufc/g até ao

fim do seu período de vida útil, o limite aplicável é 100 ufc/g para produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil, para amostras constituídas por 5 subunidades (n=5).

Os operadores das empresas do sector alimentar devem então realizar os estudos adicionais descritos acima (modelos matemáticos preditivos, testes de desafio ou testes de durabilidade) ou devem apresentar dados históricos, à autoridade competente, que o produto não excederá o limite de 100 ufc/g até ao final da sua vida útil (CE/DG SANCO, 2008).

No caso de existirem evidências que o limite de 100 ufc/g é excedido antes do final da vida útil do produto, não serem conformes ou não serem aceites pela autoridade competente os dados históricos relativos ao controlo de *Listeria monocytogenes* ou se for verificado, nos testes de desafio, que existe um potencial de multiplicação, e tal como já referido, deve ser aplicado o limite de ausência em 25g de produto (n=5) antes do produto deixar de estar sob o controlo imediato da empresa que o produziu. O produtor deste alimento deve também assegurar, segundo CE/DG SANCO (2008), que não existe contaminação por *Listeria monocytogenes* da matéria-prima para o ambiente de produção e devem ser tomadas medidas de revisão e melhoria do processo de produção e dos estudos de vida útil, de acordo com os princípios do HACCP, de forma a assegurar que o limite de 100 ufc/g não é ultrapassado antes do final da vida útil do alimento. Uma das medidas a tomar, no caso de existir um potencial de crescimento da população bacteriana, é por exemplo a diminuição do tempo de vida útil, de forma a assegurar que o limite de 100 ufc/g não é excedido antes do final do período de vida útil.

Se através dos estudos referidos ou através de dados históricos existirem dados, que a contento da autoridade competente, demonstrem que não é excedido as 100 ufc/g até ao termo do período de vida útil do produto, o limite aplicável é 100 ufc/g para produtos colocados no mercado. O operador pode também fixar limites intermédios durante o processo, que deverão ser suficientemente baixos para garantir que, no termo do período de vida útil, não seja ultrapassado o limite de 100 ufc/g, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005.

No anexo 1 desta dissertação disponibiliza-se a árvore de decisão sobre a necessidade de realização de testes de vida útil de acordo com as indicações referidas pela CE/DG SANCO (2008).

O trabalho experimental desta dissertação foi exatamente o desenvolvimento de um teste de desafio, de forma a verificar se os produtos estudados são passíveis de permitir e suportar ou não a multiplicação de *Listeria monocytogenes* durante o período de vida útil.

6. Testes de desafio

Os testes de desafio têm como objetivo fornecer informação sobre o comportamento de *Listeria monocytogenes*, quando inoculada em produtos alimentares, em condições de armazenamento definidas e controladas (CE/DG SANCO, 2008).

Estes testes podem ser desenvolvidos com dois diferentes objetivos segundo a CE/DG SANCO (2008): para determinar o potencial de crescimento da população bacteriana (1ª intenção) ou para estimar os parâmetros de crescimento da referida população (2ª intenção). Os testes de 1ª intenção determinam a capacidade da bactéria *Listeria monocytogenes* multiplicar-se nos alimentos (potencial de crescimento da população, δ) e os testes de 2ª intenção determinam a taxa de crescimento máxima da população (μ_{\max}), ou seja, quando é que, durante o período de vida útil, será mais provável que exista multiplicação e também com que taxa será essa multiplicação, permitindo assim estimar quando se torna o alimento em questão mais vulnerável a este agente patogénico, sendo que, o objetivo é estimar os parâmetros de crescimento da população bacteriana.

Os testes de desafio de primeira intenção permitem-nos classificar os alimentos como capazes ou incapazes de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes* (se o potencial de crescimento for superior a 0,5 log ufc/g, o produto é capaz de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes*) e ainda quantificar o comportamento de *Listeria monocytogenes* no alimento, nas condições testadas, entre o momento que é produzido e o momento que é consumido, ou seja, permite-nos calcular, por exemplo, a concentração máxima no início do período de vida útil que assegura que o alimento no final do seu período de vida útil cumpre com o limite de 100 ufc/g ou ainda calcular qual a concentração final que irá ser obtida com uma concentração inicial conhecida, desde que, as condições de armazenamento sejam as mesmas das utilizadas nos testes.

Os testes de desafio de segunda intenção testam os parâmetros de multiplicação do agente patogénico, permitindo-nos estimar a concentração de *Listeria monocytogenes* a um certo dia do período de vida útil do produto se a concentração inicial for conhecida, permite-nos saber qual é a curva de crescimento, qual a concentração final de *Listeria monocytogenes* no produto, se a um determinado dia do período de vida útil a concentração for conhecida e a determinação da concentração máxima que pode estar presente numa etapa da fase de produção de forma a nunca ser ultrapassado o limite de 100 ufc/g até ao final do período de vida útil do produto (CE/DG SANCO, 2008).

Os testes de desafio são relativamente fáceis de implementar, mas não são muito flexíveis na sua interpretação: os resultados só são válidos em alimentos armazenados em condições semelhantes às testadas, sendo então necessário fazer um novo teste cada vez que algum fator no processo ou na formulação é alterado. (Beaufort, 2011).

Estes testes de desafio têm uma série de fatores que influenciam todos os seus resultados: a estirpe de *Listeria monocytogenes* inoculada (sendo que é preferível inocular estirpes que

tenham sido isoladas de um produto pronto a consumir da mesma empresa, por exemplo), a contaminação inicial, as propriedades intrínsecas do alimento (pH, a_w , concentração de sal, conteúdo nutritivo, microflora associada, constituintes antimicrobianos), propriedades extrínsecas (temperatura e atmosfera de gás, condições de armazenamento desde o distribuidor até ao refrigerador doméstico), entre outros.

A contaminação inicial pode ter diferentes evoluções consoante a concentração inicial e o estado fisiológico das células contaminantes (stress bacteriano levando a mais ou menos extensão da fase lag) (CE/DG SANCO, 2008).

Estes testes de desafio são ferramentas úteis para a indústria alimentar, no sentido de permitir que tenham alguma previsão e algum controlo, mesmo que não de maneira total, no caso de se registar algum produto com alguma contaminação inicial de *Listeria monocytogenes*.

A realização destes testes permite também a implementação de limites intermédios durante o processo de produção, tal como descrito anteriormente no ponto 5 da parte II desta dissertação.

Como exemplo, com a realização deste teste conseguimos saber que, se no primeiro dia do período de vida útil do produto tivermos uma concentração inicial de 10 ufc/g de determinado agente patogénico, no último dia de vida útil desse mesmo produto, e se ele estiver exposto a condições de armazenamento semelhantes às testadas, é muito provável que tenhamos um valor próximo de 90 ufc/g, sendo este valor calculado através do potencial de crescimento, que neste caso é 0,95 log ufc/g. Estes resultados podem ser relevantes no caso de, por exemplo, uma indústria que tenha analisado um dos seus produtos e o resultado da pesquisa de *Listeria monocytogenes* em 25g de produto seja positiva, no entanto, com uma contagem abaixo dos 100 ufc/g, facilitando por exemplo a decisão do departamento de qualidade na retirada (recall) de um produto do mercado ou não, consoante os parâmetros de crescimento da população em estudo para esse produto e caso a autoridade competente assim o autorize. Estes testes permitem também saber quais os dias, no período de vida útil do produto, mais prováveis que certo agente patogénico se multiplique e quando é que o produto se torna mais vulnerável, se, por exemplo no final da sua vida útil ou no início. Assim sendo, através deste tipo de estudos consegue-se controlar e justificar decisões tomadas num caso de deteção de *Listeria monocytogenes* num produto, sendo uma mais valia para qualquer indústria de produtos prontos a consumir.

Parte III: Trabalho experimental

1. Objetivos do estudo

O presente trabalho teve como objetivo simular o comportamento de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos de aves durante o seu período de vida útil, em condições de desafio. De acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005, os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir estudos de vida útil, que devem incluir: as características físico-químicas do alimento, as várias etapas de processamento e condições de embalagem e possíveis contaminações, período de vida útil previsto e uma consulta da literatura científica disponível sobre a suscetibilidade de multiplicação e sobrevivência de microrganismos no alimento. Quando este estudo não é conclusivo em relação à segurança do alimento, os operadores das empresas do sector alimentar devem conduzir outros estudos complementares, entre os quais, os testes de desafio, com microrganismos patogénicos que são inoculados no produto, de forma a verificar se estes conseguem sobreviver e multiplicar-se no alimento. Neste trabalho experimental desenvolveram-se então dois testes de desafio em dois produtos diferentes de uma indústria alimentar com o objetivo de verificar qual o comportamento de *Listeria monocytogenes* durante o período de vida útil dos mesmos.

2. Materiais e métodos

2.1. Fatores de seleção dos produtos alimentares utilizados nos testes de desafio

A empresa dedicada ao fabrico destes produtos alimentares apresentava uma enorme diversidade de produtos pelo que, para a realização dos testes de desafio foi imperativo realizar inicialmente uma análise documental baseada no seu histórico analítico e características específicas dos produtos cárneos de aves prontos a consumir.

Esta avaliação teve em conta as condições de embalagem (tempo de vida útil, condições da embalagem, atmosfera protetora seja a utilização de atmosfera ou vácuo), características físico-químicas (pH, a_w , NaCl e humidade) e a microflora associada aos mesmos produtos.

A data de durabilidade mínima dos produtos teria de ser no máximo 90 dias de modo a ser viável a realização deste estudo, com verificação de todos os pontos do período de vida útil, portanto, o primeiro fator de seleção aplicado na escolha de produtos foi a data de durabilidade mínima.

De seguida, foram avaliados quais os produtos que são produzidos nesta indústria com o pH mais favorável para permitir a proliferação de *Listeria monocytogenes* (ou seja, com pH mais próximo de 7), sendo que, de todos os produtos produzidos, os produtos que apresentavam esta característica foram o salsichão de peru com alho e o fiambre de peru.

De acordo com os dados históricos analíticos da empresa produtora, a a_w foi outro dos fatores chave para a seleção de produtos e chegou-se à conclusão de que os produtos com o a_w mais próximo de 0,99 (ótimo para a multiplicação de *Listeria monocytogenes*) seriam também o salsichão de peru com alho e o fiambre de peru.

Em relação a características microbiológicas, de acordo com o histórico da empresa todos os produtos desta indústria apresentam elevadas contagens de microrganismos totais a 30 ° C e elevadas contagens de bactérias ácido lácticas, naturalmente presentes. Assim sendo, este ponto não foi usado como fator seletivo de produtos.

Após esta avaliação documental dos produtos cárneos prontos a consumir produzidos, foram escolhidos o salsichão de peru com alho (SP), um produto fumado, e o fiambre magro de peru (FP), produto cozido, ambos fatiados e em embalagem com atmosfera protetora.

2.2. Caracterização tecnológica dos produtos selecionados

Os produtos selecionados, o salsichão de peru com alho (SP) e o fiambre magro de peru (FP), foram produzidos tendo em conta formulações específicas e de acordo com boas práticas de higiene implementadas na indústria em questão.

O fiambre magro de peru é um produto cozido refrigerado e os seus ingredientes são: carne de perna de peru, água, fécula de batata, sal, proteína de leite, dextrose, açúcar, lactose, aromas, antioxidante (E316), regulador de acidez (E451), emulsionante (E450), espessante (E407), estabilizadores (E508) e conservante (E250). Os alérgenos leite, glúten, soja estão presentes no produto e este pode conter vestígios de sulfitos.

Este produto é produzido numa sala de preparados de carne e produtos à base de carne onde é feita a picagem da carne desmanhada de peru. A carne é depois misturada com a salmoura e é armazenada numa câmara para maturar. O fiambre de peru é então enformado numa forma quadrangular e é cozido num programa de cozedura durante 3 horas e 30 minutos. Neste programa, o produto é submetido a 72°C durante 23 minutos e 50 segundos, sendo um binómio tempo/temperatura suficiente para ser um tratamento térmico listericida. De seguida, é arrefecido num túnel a baixas temperaturas (temperaturas inferiores ou iguais a 2°C) e é armazenado na câmara de produtos intermédios, onde os operadores da zona de alto risco têm acesso. O produto é depois transferido para a zona de alto risco, onde irá ser fatiado e embalado. Antes de serem fatiados, estes produtos sofrem um arrefecimento superficial num armário de criogenia, de forma a conferir ao produto uma melhor consistência de fatiagem e uma melhor aderência da lâmina de corte da fatiadora ao produto, evitando o colapso ou rasgo das fatias obtidas (etapa tecnológica). Os produtos são deste modo fatiados numa fatiadora Weber CCS404 sendo passados depois para um tapete que os leva à máquina embaladora. Este produto é embalado numa máquina termoformadora de embalagens (Mobepack 701/1221) com as devidas embalagens (película que cobre a cuvette: PET (12my) /PE/ EVOH /PE (50my) e cuvette: APET/ PE) nas quais é injetada uma atmosfera protetora (25 a 35% de CO₂ e 65 a 75% de N₂, Air Liquide). Para além disto, é ainda neste equipamento que é colocado o rótulo pré-impresso na película que cobre a cuvette e é impresso o lote e data de durabilidade mínima do produto. Ao passar a máquina embaladora, o produto passa por um

postigo para a zona de baixo risco, onde é realizado o controlo de gases na embalagem (PBI Dansensor-3202298-B02/2014), o controlo da conformidade da embalagem, a deteção de metais (CEIA, modelo THS/21E) e o controlo de pesos. Após estas etapas, o produto é colocado numa embalagem secundária (caixas de cartão) e é transferido para as câmaras de armazenamento de produto acabado. O produto tem um prazo de validade de 60 dias e as temperaturas de conservação recomendadas são entre 0°C e 5°C.

Como pontos críticos de controlo neste processo temos: o armazenamento em câmara de refrigeração, a picagem, a mistura, o enchimento, a cozedura, o arrefecimento e o acondicionamento em atmosfera protetora associado a um detetor de metais. O perigo é biológico (desenvolvimento microbiano ou não eliminação da carga microbiana) em todas as etapas exceto no PCC associado ao acondicionamento com deteção de metais, em que o perigo é físico.

O salsichão de peru com alho é um produto fumado refrigerado e os seus ingredientes são: carne de perna de peru, água, vinho, antioxidantes (E316, E325), sal, alho, conservante (E250). O alergénio sulfito está presente no produto e este pode conter vestígios de leite, glúten e soja.

Este produto é também produzido na sala de preparados de carne e produtos à base de carne onde é feita a picagem da carne desmanhada de peru. A carne é depois misturada com a salmoura e é armazenada numa câmara para maturar. O salsichão de peru é enchido em tripa artificial e é então fumado num programa de fumagem durante mais de 4 horas. Neste programa, o produto é submetido a 72°C durante, pelo menos, 23 minutos e 50 segundos, sendo um binómio tempo/temperatura suficiente para ser um tratamento térmico listericida. Terminada a fumagem, o salsichão é curado na câmara de cura, onde os operadores da zona de alto risco têm acesso. O produto é depois transferido para a zona classificada de alto risco, onde irá ser fatiado e embalado. Antes de ser fatiado, o produto também sofre um arrefecimento superficial num armário de criogenia, de forma a permitir que a peça não se desfaça quando é fatiada (etapa tecnológica). Os produtos são então fatiados numa fatiadora Weber CCS404 sendo passados depois para um tapete que os leva à máquina embaladora. Este produto é embalado numa máquina termoformadora de embalagens (Mobepack 701/1221) com as devidas embalagens (película que cobre a cuvette: PET (12my) / PE/ EVOH /PE (50my) e cuvette: APET/ PE) e usando atmosfera protetora (25 a 35% de CO₂ e 65 a 75% de N₂). Para além disto, é ainda neste equipamento que é colocado o rótulo pré-impresso na película que cobre a cuvette e o respetivo lote e data de durabilidade mínima do produto. Ao passar a máquina embaladora, o produto passa por um postigo para a zona de baixo risco, onde é realizado o controlo de gases na embalagem (PBI Dansensor-3202298-B02/2014), o controlo da conformidade da embalagem, a deteção de metais (CEIA, modelo THS/21E) e o controlo de pesos. Após estas etapas, o produto é colocado numa embalagem secundária

(caixas de cartão) e é transferido para as câmaras de armazenamento de produto acabado. O produto tem um prazo de validade de 60 dias e as temperaturas de conservação recomendadas são entre 0°C e 5°C.

Como pontos críticos de controlo neste processo temos: o armazenamento em câmara de refrigeração, a picagem, a mistura, o enchimento, a fumagem, a cura e o acondicionamento em atmosfera protetora associado a um detetor de metais. Os perigos são biológicos (desenvolvimento microbiano de patogénicos ou não eliminação de microrganismos patogénicos) em todas as etapas exceto no PCC associado ao acondicionamento com deteção de metais, em que o perigo é físico.

Os produtos foram manipulados após o tratamento térmico, o que aumenta a probabilidade de contaminações cruzadas no entanto, esta manipulação foi realizada numa zona de alto risco da unidade. Esta zona está isolada da restante unidade sendo que, para entrar nesta área, os operadores passam por uma zona de higienização, onde se realiza a desinfeção de botas e mãos, a troca de fardamento e colocação de luvas. Esta foi a medida encontrada para minimizar a contaminação cruzada dos produtos que são manipulados após tratamento térmico.

A entrada de produtos nesta zona é realizada pela câmara de produto intermédio e a saída destes produtos (já fatiados e embalados) é pela máquina embaladora, que é o único equipamento que comunica com as duas zonas. Dentro desta zona de alto risco, ocorre o fatiamento e embalamento dos produtos.

2.3. Colheita de amostras

Foram fabricados 3 lotes de cada produto, salsichão de peru com alho (SP) e fiambre magro de peru (FP), codificados com as letras A, B e C, que representavam cada um dos três lotes e foram recolhidas 30 amostras de cada lote de cada produto, para serem analisadas em 5 dias diferentes.

A tabela 4 apresenta os dias de produção, dias de embalamento, lotes e qual o código atribuído, para cada tipo de produto. O lote do produto corresponde ao dia juliano de produção da massa e é a partir desta data que começa a contar o tempo de vida útil do produto.

Tabela 4 - Características dos diferentes lotes de produtos utilizados nos testes de desafio.

Produto	Código	Lote	Data de produção	Data de embalagem
Salsichão de peru com alho fatiado (100 g)	A	123601	26/12/2014	06/01/2015
	B	123711	06/01/2015	08/01/2015
	C	123721	07/01/2015	10/01/2015
Fiambre de peru fatiado (150 g)	A	023701	05/01/2015	08/01/2015
	B	023673	02/01/2015	05/01/2015
	C	023674	02/01/2015	07/01/2015

Os produtos salsichão de peru com alho (SP) e fiambre magro de peru (FP) foram recolhidos e transportados para o laboratório de Tecnologia dos produtos animais na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), onde foram submetidos aos testes de desafio. Os produtos foram armazenados numa câmara de refrigeração a 7°C para a realização dos testes de desafio.

As amostras, num total de 90 unidades para cada produto, foram devidamente identificadas com código, de acordo com a tabela 5, código que foi complementado com a inicial “SP” ou “FP”, conforme se tratasse de salsichão ou fiambre respetivamente. No âmbito do estudo, metade das amostras foram inoculadas sendo que, a outra metade constituiu as amostras de controlo.

Tabela 5 - Codificação das amostras utilizadas nos testes de desafio.

Grupo/lote/nº da amostra		Dias de análise – teste de desafio				
Grupo Inoculados		0	15	30	60	72
A (n=15)	1	1A0	1A15	1A30	1A60	1A72
	2	2A0	2A15	2A30	2A60	2A72
	3	3A0	3A15	3A30	3A60	3A72
B (n=15)	1	1B0	1B15	1B30	1B60	1B72
	2	2B0	2B15	2B30	2B60	2B72
	3	3B0	3B15	3B30	3B60	3B72
C (n=15)	1	1C0	1C15	1C30	1C60	1C72
	2	2C0	2C15	2C30	2C60	2C72
	3	3C0	3C15	3C30	3C60	3C72
Grupo Controlo		0	15	30	60	72
A (n=15)	1	C-1A0	C-1A15	C-1A30	C-1A60	C-1A72
	2	C-2A0	C-2A15	C-2A30	C-2A60	C-2A72
	3	C-3A0	C-3A15	C-3A30	C-3A60	C-3A72
B (n=15)	1	C-1B0	C-1B15	C-1B30	C-1B60	C-1B72
	2	C-2B0	C-2B15	C-2B30	C-2B60	C-2B72
	3	C-3B0	C-3B15	C-3B30	C-3B60	C-3B72
C (n=15)	1	C-1C0	C-1C15	C-1C30	C-1C60	C-1C72
	2	C-2C0	C-2C15	C-2C30	C-2C60	C-2C72
	3	C-3C0	C-3C15	C-3C30	C-3C60	C-3C72

2.4. Avaliação de produtos e ambiente fabril quanto à presença de *Listeria monocytogenes*: obtenção de isolados para inoculação no produto

Para a realização destes testes de desafio tornou-se importante utilizar estirpes selvagens de *Listeria monocytogenes* que naturalmente estariam presentes na indústria que produz os produtos.

Para realizar a inoculação dos produtos foi necessário obter isolados selvagens de *Listeria monocytogenes* eventualmente presentes em produtos cárneos e no ambiente fabril da fábrica. Desta forma, estaria a ser mimetizada uma contaminação cruzada accidental, que poderia acontecer neste ambiente.

Assim sendo, foram recolhidas amostras e foi realizada pesquisa de *Listeria monocytogenes* em diversas superfícies em diferentes dias de produção, principalmente na zona de alto risco: na máquina fatiadora (antes e depois da passagem de produto), nas mãos da operadora que coloca o produto na fatiadora, na embaladora e no tapete entre a máquina fatiadora e a máquina embaladora (antes e depois da passagem de produto).

A colheita das superfícies na zona de alto risco foi realizada porque é o local onde pode acontecer uma contaminação cruzada accidental do produto e porque é o local onde o produto é manipulado após a confeção térmica. Foram recolhidas amostras de cada uma das superfícies de contacto numa área de 1000 cm² com cotonetes esterilizados e embebidos em solução de Ringer com Tween 80 (Scharlau, Espanha) e depois de recolhida a amostra, foram colocados num tubo esterilizado com 5 ml da referida solução.

Foram também recolhidas amostras na matéria prima (carne de peru e de frango) utilizada na produção dos produtos cárneos prontos a consumir. A matéria prima utilizada nos produtos selecionados foi a carne de peru, no entanto optou-se por recolher amostras tanto de carne de peru como de carne de frango, já que, todos os produtos prontos a consumir nesta indústria são produzidos e preparados na mesma sala e com os mesmos equipamentos, podendo a contaminação, no caso de ser proveniente da matéria prima, ser proveniente do peru ou do frango. Recolheram-se 100 g de cada amostra de matéria-prima sendo que, foram transportadas em saco fechado até ao laboratório.

O resumo das amostras recolhidas está presente na tabela 6. A recolha das amostras para análise microbiológica foi realizada de acordo com o descrito na NP 1828 (1982). Todas as amostras recolhidas foram transportadas em caixa isotérmica, a temperaturas de refrigeração para o laboratório de tecnologia e segurança dos alimentos na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL), onde foram preparadas de acordo com a NP 1829 (1982).

Tabela 6 - Amostras recolhidas para isolamento de *Listeria monocytogenes*.

Código	Local	Ponto de processamento	Data de colheita
F1	Máquina fatiadora	Depois da passagem de produto	04/11/2014
M1	Mãos da operadora	Depois da passagem de produto	04/11/2014
T1	Tapete	Depois da passagem de produto	04/11/2014
Fi2	Máquina fatiadora	Antes da passagem de produto	05/11/2014
Ff2	Máquina fatiadora	Depois da passagem de produto	05/11/2014
T2	Tapete	Antes da passagem de produto	05/11/2014
F3	Máquina fatiadora	Depois da passagem de produto	07/11/2014
M3	Mãos da operadora	Depois da passagem de produto	07/11/2014
T3	Mãos da operadora	Depois da passagem de produto	07/11/2014

Código	Descrição do produto	Data de colheita
Cru1	Bife de peru	05/11/2014
Cru2	Preparado de peru para escalopes	07/11/2014
Cru3	Mistura de frango congelado	07/11/2014
Cru4	Bife de frango	11/11/2014

2.4.1. Pesquisa e identificação de *Listeria monocytogenes*

Após a chegada das amostras ao laboratório realizou-se um pré-enriquecimento das mesmas. Este pré-enriquecimento consiste em adicionar caldo *Half Fraser* (*Listeria Enrichment Broth Base according to Fraser* e *Listeria Selective Supplement for Primary Enrichment (Half Fraser)*, Scharlau, Espanha) (figura 3) a cada uma das amostras na proporção de 1:9. Nas amostras de produtos alimentares, após pesagem de 25 g, foi adicionado 225 ml de *Half Fraser* e nas amostras de superfícies foi adicionado 45 ml. As amostras com produtos alimentares foram homogeneizadas num equipamento Stomacher 400 (LabBlender) durante cinco minutos.

As amostras com *Half Fraser* foram colocadas à temperatura de 30°C durante 24 horas.

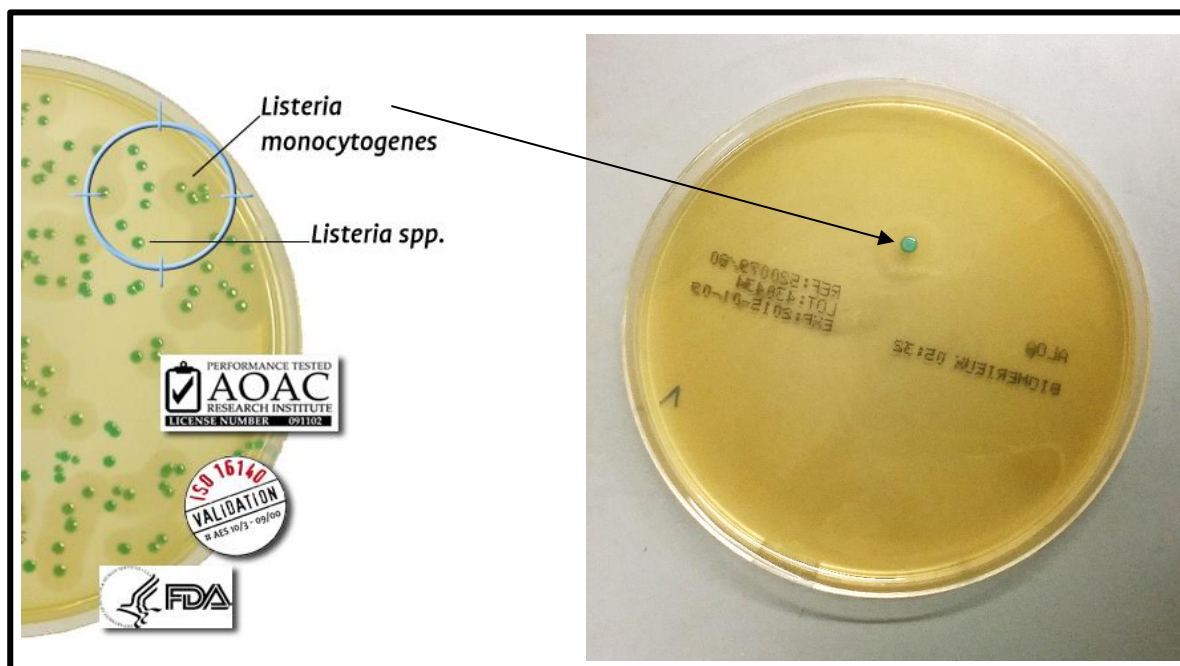
Figura 3 - Meio *Fraser* (à esquerda) e meio *Half Fraser* (à direita). (fotografia original)



Seguiu-se após este pré-enriquecimento, um enriquecimento seletivo em meio *Fraser* (*Listeria Enrichment Broth Base according to Fraser* e *Listeria Selective Supplement for Secondary Enrichment*, Scharlau, Espanha) (figura 3), adicionando 0,1 ml de cada amostra pré-enriquecida a 10 ml de caldo e incubando-se a uma temperatura de 37°C durante 48 horas (ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004).

As culturas após incubação foram semeadas por estria com esgotamento com o auxílio de uma ansa de 3 mm (equivalente a 10 µl) em meio seletivo Agar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti (ALOA, BioMérieux, França). As placas ALOA foram depois incubadas a 37°C durante 24 horas. As colônias características de *Listeria spp.* apresentam-se com cor verde azuladas em fundo amarelado, sendo que existe uma forte probabilidade de se tratar de *Listeria monocytogenes* quando existe um halo opaco à volta da colônia verde azulada. A figura 4 demonstra a diferença entre colônias de *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* nas placas ALOA.

Figura 4 - Colónias típicas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* (Imagem da esquerda adaptada de BioMérieux, 2017) (Fotografia original à direita)



Para confirmação das colónias suspeitas de *Listeria monocytogenes* foi efetuada repicagem de colónias características (azuis com halo) para meio de TSA (Tryptona Soja Agar, Scharlau Chemie, Barcelona) seguida de incubação a 37°C durante 24 horas. Seguiu-se a observação por transiluminação de Henry (Fraqueza *et al.*, 2006), das colónias que cresceram no meio TSA. Em meio TSA, à lupa e com uma inclinação da luz a 45° consegue-se diferenciar *Listeria monocytogenes* de outras espécies do género *Listeria*. A bactéria *Listeria monocytogenes* aparece neste meio com uma coloração azulada e translúcida, parecendo-se com gotas de água quando a luz incide com a inclinação referida enquanto que as restantes espécies do género *Listeria* aparecem com uma coloração amarelada e opaca. Para confirmação da presença de *Listeria monocytogenes* foi necessário recorrer-se ainda a outras técnicas de identificação.

2.4.2. Identificação de *Listeria monocytogenes* por PCR

A extração do DNA das células bacterianas foi realizada por fervura, que consiste na colocação do máximo de cultura num tubo de eppendorf com 1 ml de tampão TE, composto por Tris (10mM) (tampão de pH) e EDTA (1 mM). Centrifugou-se a 12000 rotações por minuto, durante 10 minutos, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 200µL de água HPLC (High Performance Liquid Chromatography) esterilizada. Incubou-se a 100°C, durante 10 minutos, e, seguidamente, colocou-se os tubos em gelo, durante 1 minuto. Realizou-se nova centrifugação (12000 rotações por minuto, durante 5 minutos). Por fim,

descartou-se o sedimento e preservou-se o sobrenadante, com o DNA, a 4°C, para posterior realização de PCR.

A identificação da espécie foi realizada por métodos moleculares de reações de polimerase em cadeia (PCR) (Simon, Gray & Cook, 1996; Talon *et al.*, 2007). O PCR foi realizado em termociclador (Doppio, VWR®). Os primers utilizados foram os que se reportam ao gene *prfA*, em que LIP1 e LIP2 são referentes aos nucleótidos 634 a 654 (5'-GATACAGAAACATCGGTTGGC-3') e 886 a 907 (5'-GTGTAACCTTGATGCCATCAGG-3') respectivamente, os quais dão origem a um produto de 274 pb (Simon, Gray & Cook, 1996; Talon *et al.*, 2007). Foram utilizados uma Taq polimerase (NZYTech, Portugal) e reagentes (NZYTech, Portugal). O controlo positivo utilizado foi *Listeria monocytogenes* CCET 937, uma estirpe referência. As condições da reação, reagentes e suas concentrações estão descritas na tabela 7.

Tabela 7 - Condições de realização de PCR para identificação de *Listeria monocytogenes* (adaptado de Simon *et al.*, 1996; Talon *et al.*, 2007).

Reagentes para a mistura		Volume
	Água Miq esterilizada	28,9 µl
	Tampão PCR 10x	5 µl
	MgCl ₂ 50mM	2,5µl
	Mix dNTPs *	0,3µl
	Primer LIP1 (50 µM)	0,3 µl
	Primer LIP2 (50 µM)	0,3 µl
	vBSA (10 mg/kg)	5 µl
	Taq DNA polimerase	0,2 µl
	Amostra DNA	5 µl
Condições do termociclador		
Etapa	Temperatura	Tempo
Pré-incubação	94 °C	2 minutos
40 ciclos:		
Desnaturação	94 °C	0,30 segundos
Annealing	55 °C	0,30 segundos
Extensão	74 °C	1 minuto
Incubação Final	74 °C	5 minutos

Legenda:

*Mix dNTPs é constituído por 50 µL de cada um dos quatro nucleótidos citosina, adenina, guanina, timina; µL: microlitro; mM: milimolar; µM: micromolar.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (SeaKem® LE Agarose, Rockland, ME USA), em TBE 1X (tampão TBE 1x é composto por 89 mM (milimolares) de Tris HCl a pH 7,6; 2 mM de EDTA e 89 mM de ácido bórico), a 100 Volts durante 30 minutos. Analisou-se 5 µL de produto de PCR, juntamente com 2 µL de tampão azul de bromofenol e 2 µL de gel red. A identificação de *Listeria monocytogenes* faz-se quando a amplificação gera produtos de PCR com 274 pares de base (pb), tal como já referido. Utilizou-se 5 µL do marcador de DNA molecular (NZYDNAladder III, NZYTech, Portugal). A revelação do gel foi feita num transiluminador de UV (ImageMaster, pHarmacia Biotech, Suécia).

2.4.3. Identificação de *Listeria monocytogenes* por API*Listeria*.

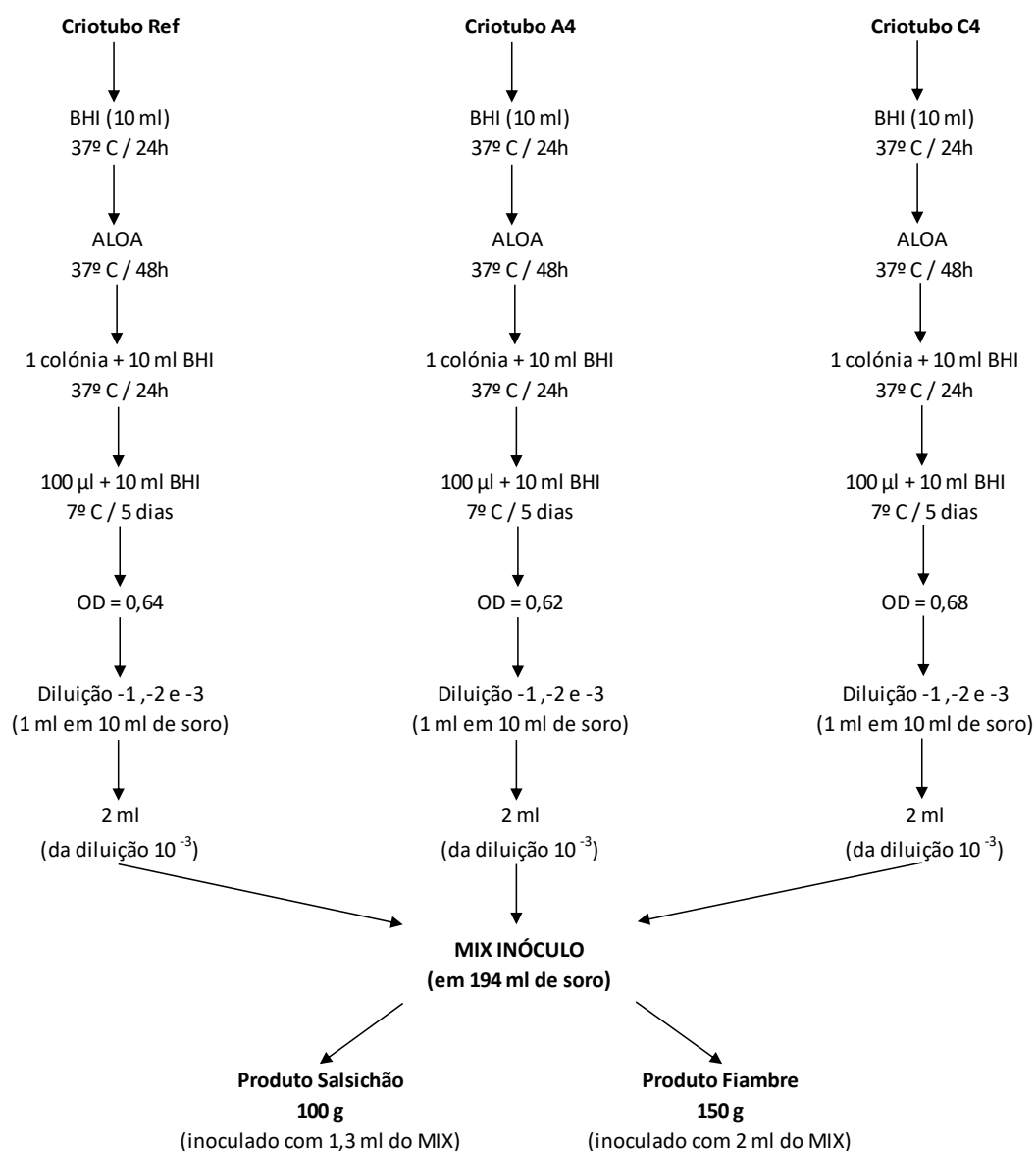
A identificação de *Listeria monocytogenes* e de outras espécies foi também realizada recorrendo-se ao teste bioquímico API*Listeria* (BioMérieux, França), efetuado de acordo com as instruções do fabricante nas colónias mais suspeitas.

2.5. Preparação do inóculo a utilizar nos testes de desafio

O inóculo utilizado nos testes de desafio foi obtido através de mistura de três isolados de *Listeria monocytogenes*: uma estirpe referência (U937), identificada com o código “Ref”; um isolado selvagem proveniente de uma amostra analisada através da avaliação de produtos e do ambiente fabril quanto à presença de *Listeria monocytogenes* desenvolvida neste trabalho experimental, identificada com o código “C4”; e um isolado selvagem recolhido noutra estudo realizado na mesma indústria e pertencente à coleção do laboratório de Tecnologia e Segurança dos Alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, identificado com o código “A4”.

Estes isolados foram preparados pela mistura de volumes semelhantes da sua cultura de modo a ser obtida uma concentração entre 10^3 e 10^5 ufc/ml no preparado de inóculo utilizado (Mix) e de forma a inocular entre 10^1 e 10^3 ufc/g no produto, de acordo com o protocolo descrito na Figura 5.

Figura 5 - Esquema de preparação da Mix de inóculo.



Assim sendo, calculou-se anteriormente que, utilizando o protocolo demonstrado na Figura 5 para a preparação das 3 estirpes, obtinha-se na diluição 10^{-3} , após 5 dias a 7°C em BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, Scharlau, Espanha), uma densidade ótica da solução (*optical density*, $\text{OD}_{625\text{nm}}$) entre 0,5 e 0,7 o que equivale a uma concentração entre $1,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ ufc/ml. Seguindo este protocolo (figura 7), a mix de inóculo (ou seja, a mistura com as 3 estirpes utilizadas) contém entre $4,5 \times 10^3$ e $4,5 \times 10^4$ ufc/ml.

Seguindo o protocolo definido, o produto salsichão de peru é inoculado com 1,3 ml da mix de inóculo, sendo contaminado com *Listeria monocytogenes* numa concentração entre $5,8 \times 10^1$ e $5,8 \times 10^2$ ufc/g e o produto fiambre de peru é inoculado com 2 ml da mix de inóculo, sendo contaminado com *Listeria monocytogenes* numa concentração entre 6×10^1 e 6×10^2 ufc/g. A diferença de quantidade de inóculo nos produtos deve-se apenas ao facto de que o produto SP tem 100 gramas de peso e o produto fiambre tem 150 gramas, sendo que, foi necessário

este ajuste para que a contaminação inicial em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) fosse semelhante nos dois produtos.

A mistura das três estirpes de *Listeria monocytogenes* foi analisada no dia 0 dos testes de desafio de forma a identificar qual a concentração da contaminação inicial utilizada nos produtos.

Prepararam-se as amostras e realizaram-se diluições decimais, tantas quantas consideradas necessárias, seguindo a técnica descrita na NP 3005 (1985).

2.6. Método dos testes de desafio

O protocolo usado foi uma adaptação do guia técnico de testes de desafio com *Listeria monocytogenes* em produtos prontos a comer (Beaufort *et al.*, 2014).

Para este ensaio, as amostras de produtos que foram inoculadas com *Listeria monocytogenes* foram reembaladas numa máquina de vácuo de câmara simples (EVT-7-CD Tecnotrip, Espanha) usando sacos polilaminados “HBX-070” (R. Bayer, Alemanha), de alta impermeabilidade ao O₂ e CO₂ (filme EVOH com permeabilidade: O₂ =8,3 cm³, CO₂ =23 cm³, N₂ =3 cm³ e ao vapor de água=1,3 cm³), sob atmosfera modificada (Aligal 13; Air Liquide, Lote: 113011431575000), com uma concentração de CO₂ entre 25 e 35% e uma concentração de N₂ entre 65 e 75%.

A concentração e o tipo de gás utilizado foram os mesmos que na embalagem de atmosfera protetora original dos produtos (Figura 6).

Figura 6 - Equipamentos utilizados no reembalamento das amostras que foram inoculadas.



Legenda: À esquerda a máquina de vácuo de câmara simples, onde é retirado o ar presente na embalagem e injetada a atmosfera modificada (EVT-7-CD Tecnotrip, Espanha) e à direita o gás utilizado na atmosfera protetora (Aligal 13, Air Liquide, Lote: 113011431575000).

As amostras de produtos inoculados e não inoculados foram armazenadas em câmara de refrigeração a 7°C durante 72 dias. Os produtos foram armazenados a uma temperatura de “desafio”, ou seja, ligeiramente acima do recomendado para a conservação destes produtos

(sendo que, para estes produtos era 0 a 5°C). A temperatura de armazenamento escolhida foi 7°C durante todo o período de vida útil. Apesar desta temperatura estar definida para 7°C, este teste foi ainda mais um “desafio” porque a câmara onde estiveram armazenados os produtos durante a realização dos testes, avariou e estes foram expostos a temperaturas de aproximadamente 10°C durante 2 dias. No anexo 2 desta dissertação está disponível o gráfico de temperaturas de armazenamento dos produtos em teste de desafio.

Foram usados três lotes diferentes do mesmo produto nestes testes, tal como referido. Os códigos utilizados para os três lotes foram lote A, B e C.

2.7. Avaliação das características físico-químicas dos produtos

As características físico-químicas e as condições de embalagem (concentração dos gases da atmosfera modificada) foram medidas numa amostra de controlo negativo de cada produto nos dias 9, 38 e 72.

2.7.1. Avaliação da concentração de gases na embalagem

A medição da concentração dos gases (CO₂ e O₂) na embalagem de atmosfera modificada (MAP) foi conseguida através da utilização do equipamento “headspace analyzer Dansensor” (modelo CheckPoint, modelo PBI-320298-B02/2014, número de série: 58142880), segundo o método definido pelo fabricante do aparelho.

2.7.2. Determinação do pH

Medição do pH (Figura 7) através do equipamento Meat pH Meter (HANNA Instruments, modelo HI 99163, número de série: B0064485), de acordo com a NP-3441 (1990).

Figura 7 – Medição de pH através do equipamento Meat pH Meter.



2.7.3. Determinação da atividade da água (a_w)

Medição de a_w (Figura 8) usando o equipamento Rotronic (modelo HygroPalm23-AW-A, número de série: 0061122785, ano de fabrico: 2014), previamente calibrado (com padrões de humidade relativa de 11,75%, 35%, 50,66% e 78%, a uma temperatura de 23,58 °C).

Figura 8 – Medição de a_w usando o equipamento Rotronic.



2.8. Avaliação microbiológica

Foi realizada contagem de microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C e bactérias ácido lácticas (BAL) a uma amostra de cada lote em cada dia de análise (tanto nas amostras controlo como nas inoculadas).

A pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* foram realizadas em todas as amostras de cada lote em cada dia de análise (tanto nas amostras controlo como nas inoculadas).

2.8.1. Preparação de amostras

A preparação das amostras foi efetuada segundo as recomendações da NP 2079 (1989). A partir da suspensão-mãe realizaram-se diluições decimais seriadas, tantas quantas consideradas necessárias, seguindo a técnica descrita na NP 3005 (1985).

2.8.2. Contagem de microrganismos totais a 30°C

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C, foi realizada de acordo com a ISO 4833:2003, após preparação e diluição da amostra foi efetuada uma sementeira por incorporação de 1 ml das diluições decimais, em meio de cultura de *Tryptone Glucose Extract Agar* (TGE-agar, Scharlau, Espanha). Após homogeneização, as placas foram incubadas por um período de 24 a 48 horas à temperatura de 30°C. Todas as placas com número de colónias entre 15 e 150 foram tidas em consideração para contagem e o resultado foi apresentado em logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama de produto (log ufc/g).

2.8.3. Contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem de bactérias ácido lácticas foi realizada de acordo com a ISO 15214:1998. Após preparação e diluição da amostra foi inoculado, por sementeira de incorporação, 1 ml das diferentes diluições decimais em meio MRS agar (Man Rogosa & Sharp agar, Scharlau, Espanha). A incubação foi realizada à temperatura de 30 °C por um período de 48 horas em ambiente anaeróbio (GENbox anaer, BioMérieux, França). Todas as placas com número de colónias entre 15 e 150 foram tidas em consideração para contagem e o resultado foi apresentado em logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama de produto (log ufc/g).

2.8.4. Pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes*

Foi realizada a pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* em todas as amostras, de acordo com a ISO 11290-1 e 2 (2004).

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada seguindo o protocolo descrito no ponto 2.4.1. da parte II desta dissertação.

A contagem de *Listeria monocytogenes* foi realizada após pesagem de 10 g de amostra para um saco esterilizado seguido da adição de 90 ml de APT (água peptonada tamponada, Panreac, Espanha). A suspensão-mãe, que corresponde a uma diluição 10^{-1} , foi homogeneizada num equipamento Stomacher 400 (LabBlender) durante dois minutos e colocada a 20 °C durante 1 hora. Após este período, foram realizadas as diluições decimais e realizou-se sementeira por espalhamento de 0,1 ml de cada diluição em uma placa ALOA (BioMérieux, França). As placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 24 a 48 horas.

Segundo a ISO 11290-2 (2004) confirma-se, através de outros métodos adicionais, se as colónias presuntivas são de *Listeria monocytogenes* ou *Listeria spp.* Foram tidas em consideração para contagem todas as placas com número de colónias entre 15 e 150 e o resultado foi apresentado em logaritmo de unidades formadoras de colónias por grama de produto (log ufc/g).

2.9. Análise estatística dos resultados

Os dados foram analisados usando Microsoft Office Excel 2013 e software SAS (versão 9.4). O procedimento GLM (*general linear models*) do SAS foi usado para avaliar o comportamento da bactéria *Listeria monocytogenes* durante a vida útil dos produtos, de modo a aferir equações de regressão polinomial ($y=a+bx+cx^2$) e equações de regressão linear ($y=a+bx$), quando existe significância estatística ($p < 0,05$).

Para avaliar se a proliferação de *Listeria monocytogenes* e das bactérias ácido-lácticas tinha alguma correlação estatisticamente significativa e para determinar os coeficientes de correlação, foi utilizado o procedimento CORR (*correlation*) do SAS.

O potencial de crescimento da população bacteriana (δ) foi calculado através da diferença entre a concentração média no dia final e a do dia inicial dos testes.

A taxa de crescimento máxima da população bacteriana (μ_{\max}) foi calculada pela fórmula $\frac{\Delta y(a-b)}{\Delta t(a-b)}$, que representa a diferença na concentração (y) de *Listeria monocytogenes* (log ufc/g) em dois dias de análise (a e b) divididos pelo tempo (t), em dias, entre a e b.

3. Resultados e discussão

3.1. Obtenção de isolados de *Listeria monocytogenes*

Na tabela 8 apresentam-se os resultados de pesquisa de *Listeria monocytogenes* efetuados em diferentes amostras recolhidas de ambiente fabril e de produtos crus de frango com matéria-prima similar à usada no fabrico dos produtos transformados em estudo.

Tabela 8 - Resultados obtidos nos diferentes métodos de pesquisa de *Listeria monocytogenes* em todas as amostras analisadas.

Código	Descrição da amostra	Resultado presuntivo em ALOA	Confirmação por API	Confirmação por PCR
F1	Máquina fatiadora	Negativo	-	-
M1	Mãos da operadora	Negativo	-	-
T1	Tapete	Negativo	-	-
Fi2	Máquina fatiadora	Negativo	-	-
Ff2	Máquina fatiadora	Negativo	-	-
T2	Tapete	Negativo	-	-
F3	Máquina fatiadora	Negativo	-	-
M3	Mãos da operadora	Negativo	-	-
T3	Mãos da operadora	Negativo	-	-
Cru1	Bife de peru	Positivo	-	-
Cru2	Preparado de peru para escalopes	Positivo	<i>Listeria welshimeri</i> (99,9%)	Negativo
Cru3	Mistura de frango congelado	Positivo	-	-
Cru4	Bife de frango	Positivo	<i>Listeria monocytogenes</i> (99,9%)	Positivo

Apenas amostras de produtos crus (bifes de peru, preparado de peru para escalopes, mistura de frango e bifes de frango), ou seja, da matéria-prima utilizada nesta indústria, foram positivas para a presença de *Listeria monocytogenes*, em meio ALOA.

Este agente patogénico não foi detetado no ambiente fabril, em nenhuma das superfícies onde foi realizada pesquisa.

A prevalência de *Listeria monocytogenes* em carne de aves crua, segundo estudos desenvolvidos em Portugal, pode chegar aos 60% (Mena *et al*, 2004; Fraqueza, Ferreira, & Barreto, 2006).

É preocupante que a prevalência deste agente patogénico seja alta na carne de aves crua, um produto cada vez mais consumido, na perspetiva que o consumidor pode não estar completamente ciente do risco que corre ao manipular produtos crus na sua cozinha, se as boas práticas de higiene e manipulação não forem cumpridas.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os métodos de prevenção da contaminação cruzada por *Listeria monocytogenes* na indústria em questão demonstraram ser eficazes já que, nas superfícies de contacto com alimentos, desde mãos de operadores, à máquina fatiadora e o tapete por onde circulam os alimentos, todas as amostras de superfícies recolhidas da zona de alto risco apresentaram resultados negativos.

As boas práticas de higiene e laboração e as medidas de prevenção da contaminação cruzada são essenciais para que não exista contaminação desta zona e consequentemente dos produtos que por ela passam.

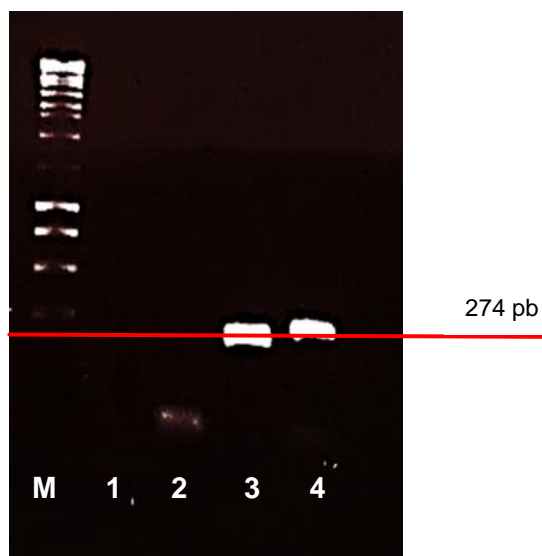
Apesar de, presuntivamente, se ter obtido isolados suspeitos de *Listeria monocytogenes* de todas as amostras de matérias-primas cruas analisadas, apenas na amostra “Cru 4” (bife de frango) foi confirmada a identificação do isolado suspeito como *Listeria monocytogenes* através de técnica de PCR (Tabela 9 e Figura 9).

Este isolado foi utilizado para a inoculação de produto nos testes de desafio desenvolvidos nesta dissertação.

Tabela 9 - Códigos das amostras, materiais usados e resultados obtidos na realização de PCR para deteção de *Listeria monocytogenes*.

Código	Amostra	Resultado
M	Marcador NZYDNA ladder III (NZYTech, Portugal)	
1	Controlo negativo (sem taq polimerase)	Negativo
2	Cru 2	Negativo
3	Cru 4	Positivo
4	Controlo positivo - estirpe referência CCET 937	Positivo

Figura 9 - Resultados obtidos na realização de PCR para detecção de *Listeria monocytogenes*.



Legenda: Linha vermelha nos 274 pares de bases, indicador de presença de *Listeria monocytogenes*. Marcador NZYDNA ladder III (com 14 bandas, entre os 200 e os 1000 pb, NZYTech, Portugal), com o código “M”; controlo negativo, com o código “1”; isolado da amostra Cru 2, com o código “2”; isolado da amostra Cru 4, com o código “3”; controlo positivo - estirpe referência (CCET937), com o código “4”.

3.2. Características do inóculo utilizado nos testes de desafio

As estirpes de *Listeria monocytogenes* utilizadas para constituir o inóculo utilizado nos testes de desafio foram: uma estirpe referência (*Listeria monocytogenes* ATCC U937) e dois isolados selvagens obtidos a partir de amostras recolhidas na indústria que produz os produtos que iriam ser testados: uma a partir do produto cru 4 (C4) e outra a partir de um produto pronto a consumir (A4), sendo que, esta última estirpe foi recolhida noutra estudo realizado na mesma indústria e pertencente à coleção do laboratório de Tecnologia e Segurança dos alimentos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

A mistura das três estirpes preparada e utilizada (mix) na inoculação das amostras em testes de desafio, tinha uma concentração de *Listeria monocytogenes* de aproximadamente 3×10^4 ufc/ml.

Esta concentração da mix permitiu que o produto SP fosse contaminado, no dia 0 do teste de desafio, com aproximadamente 6×10^4 unidades formadoras de colónia de *Listeria monocytogenes*, demonstrando-se assim que a contaminação inicial do produto foi na ordem dos 2,6 log ufc por grama de produto (aproximadamente 4×10^2 ufc/g).

O produto FP foi contaminado com aproximadamente $3,9 \times 10^4$ unidades formadoras de colónia de *Listeria monocytogenes* e a contaminação do produto ficou estabelecida em 2,6 log ufc por grama de produto (aproximadamente 4×10^2 ufc/g).

De acordo com Beaufort *et al.* (2014), nos testes de desafio com *Listeria monocytogenes* deve-se utilizar uma concentração de inóculo entre 10^1 e 10^2 ufc por grama de produto, sendo assim a concentração de inóculo por grama de produto utilizada (4×10^2 ufc/g) no teste de desafio desenvolvido neste trabalho experimental ficou ligeiramente acima do recomendado.

Segundo um estudo desenvolvido por Everis e Betts (2013), onde foram avaliados dois protocolos distintos de testes de desafio, chegou-se à conclusão que uma concentração de inóculo baixa, tal como recomendado por Beaufort *et al.* (2014), apesar de ser a quantidade de inoculação representativa do nível mais provável de *Listeria monocytogenes* presente no alimento, pode levar a problemas na fiabilidade dos dados, sendo que, existe grande variabilidade no potencial de crescimento e na fase lag de populações bacterianas pequenas. Foi ainda concluído neste estudo, que existem resultados semelhantes quer a concentração inicial utilizada no teste de desafio seja de 10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5 ufc/g. De acordo com a cinética das células bacterianas, a proliferação de 1 célula para 100 células leva ao desenvolvimento do mesmo número de gerações que a proliferação de 100 a 10000 células ou de 1000 a 100000 células, isto é, uma multiplicação de 2 log. Se um teste de desafio avaliar o tempo necessário para exceder a proliferação 2 log, em vez de a proliferação de 1 a 100 células, é mais pratico e ultrapassa os problemas de uma baixa concentração de inóculo inicial, sendo obtidos os mesmos resultados (Everis & Betts, 2013).

Assim sendo, não foi valorizado o facto de a concentração de inóculo por grama de produto utilizada no teste de desafio desenvolvido neste trabalho experimental ser acima do valor recomendado.

3.3. Resultados dos testes de desafio

3.3.1. Características de concentração de gases dos produtos testados

De forma a ser obtida informação de como estariam as condições de embalagem dos produtos testados, foi medida a percentagem de oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) na embalagem de três amostras (uma de cada lote), de cada produto, nos dias 9, 38 e 72 dos testes de desafio. Tal como já referido, estes produtos foram reembalados, após a inoculação, em atmosfera protetora, com a presença de dióxido de carbono e azoto (65-75% N_2 + 25-35% CO_2).

No produto salsichão de perú (SP), a concentração de O_2 no dia 9 do teste de desafio (9 dias depois da inoculação das amostras) tinha valores médios de 0,2%, no dia 38 registaram-se valores de 0,3% de O_2 e no último dia do teste de desafio (dia 72) observou-se que a concentração de O_2 na embalagem dos produtos estava, em média, nos 0,73% (Tabela 10). Assim sendo, a concentração de O_2 aumentou significativamente ($p < 0,05$) no decorrer dos testes de desafio. A concentração de CO_2 no produto SP manteve-se constante durante o período de teste. No dia 9 observaram-se valores, em média, de 25,4% de CO_2 , no dia 38, de aproximadamente 24% e no último dia dos testes de desafio obteve-se valores médios de 23,4% de concentração de CO_2 (Tabela 10).

No produto fiambre de perú (FP), tal como se observa na tabela 10, a concentração de O_2 no dia 9 do teste de desafio encontrava-se em valores médios de 0,2%, mas também foi observado que neste produto a concentração de O_2 aumentou significativamente ($p < 0,05$) no

decorrer dos testes de desafio para valores de 0,6%. A concentração média de CO₂ no produto FP variou entre 26,23%, e 24,47%, contudo esta diferença ao longo dos testes de desafio não foi considerada significativa.

Tabela 10 - Características de embalagem e atmosfera modificada dos produtos testados.

Produto	Dia de análise	Concentração de O ₂	Concentração de CO ₂
SP	9 (n=3)	0,20 ± 0,08	25,40 ± 1,55
	38 (n=3)	0,30 ± 0,24	24,07 ± 1,77
	72 (n=3)	0,73 ± 0,29	23,40 ± 1,65
FP	9 (n=3)	0,20 ± 0,08	26,23 ± 1,59
	38 (n=3)	0,17 ± 0,17	26,03 ± 0,90
	72 (n=3)	0,60 ± 0,29	24,47 ± 0,63

Legenda: Os valores apresentados representam a média e respetivo desvio-padrão dos valores obtidos em cada dia de análise.

O gás inibitório de microrganismos aeróbios, CO₂, manteve-se portanto, em valores médios de 25% durante o período de vida útil dos produtos. Segundo a bibliografia (Magalhães *et al.*, 2014; Iranzo *et al.*, 2015), a multiplicação de *Listeria monocytogenes* acontece em condições aeróbias, mas é otimizada em condições anaeróbias. As concentrações de CO₂ nas embalagens dos produtos estudados (concentrações entre 25% e 35% de CO₂) não são suficientemente altas para que ocorra a inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes*, essa inibição dá-se apenas em concentrações superiores a 50% (Magalhães *et al.*, 2014; Iranzo *et al.*, 2015). O uso de CO₂ e N₂ na embalagem do produto estende a fase lag dos microrganismos aeróbios e favorece a multiplicação de microrganismos anaeróbios ou anaeróbios facultativos, como é o caso das bactérias ácido-lácticas (Rossaint, Klausmann & Kreyenschmidt, 2015).

Assim sendo, os produtos testados estão embalados em atmosferas modificadas, ditas protetoras, que permitem a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Contudo, apesar de não terem qualquer efeito inibitório direto no desenvolvimento deste microrganismo, favorecem a multiplicação de bactérias lácticas, que poderão por competição inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*.

A manutenção da composição de gás apropriada numa embalagem de atmosfera modificada não é fácil, pois são inevitavelmente criadas algumas transferências de gás através do material de embalagem (isto é, permeabilização do material) (Chaix, Guillaume & Guillard,

2014). Mesmo quando se utilizam materiais com elevadas capacidades de barreira à permeabilização de gases, que permitem a manutenção da atmosfera interna original, ocorrem transferências de gás entre o espaço vazio na embalagem e o género alimentício (solubilização) e dentro do alimento (ou seja, difusão) levando a mudanças na concentração inicial da atmosfera na embalagem (Chaix *et al*, 2014).

Apesar de existir um ligeiro aumento na concentração de O₂ na embalagem dos dois produtos e de algumas embalagens não atingirem os 25% de CO₂, os valores obtidos estão sempre dentro dos limites definidos no HACCP destes produtos, sendo que, o limite para o CO₂ é um mínimo de concentração de 20% e o limite para o O₂ é um máximo de concentração de gás na embalagem de 2%. Assim sendo, durante o teste de desafio, não foram registados valores que ultrapassem os limites definidos pela empresa para os produtos testados.

Para a realização do teste de desafio desenvolvido, os resultados obtidos através da análise das características dos gases da embalagem ao longo da vida útil dos produtos revela que as condições de conservação da embalagem foram mantidas. Isto é, as embalagens de produto inoculadas estiverem embaladas de acordo com as condições comerciais de embalamento dos produtos.

3.3.2. Características físico-químicas dos produtos testados

As características físico-químicas (pH e a_w) dos produtos foram medidas numa amostra de cada lote, de cada produto, nos dias 9, 38 e 72 dos testes de desafio encontrando-se resumidas na tabela 11.

Os produtos SP e FP, apresentaram inicialmente valores de pH de 6,27 e 5,91, respetivamente, observando-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) do valor de pH ao longo do tempo em que decorreram os testes de desafio.

O produto SP atingiu valores de pH de 5,79 enquanto que o produto FP atingiu valores de 5,37 no dia 72 dos testes de desafio.

Tal como se observa na tabela 11, o produto SP demonstrou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) da a_w ao longo do tempo. No produto SP observaram-se valores médios da a_w de 0,892 no dia 9, com uma diminuição a 0,799 no dia 72.

No produto FP a variação observada nos valores da a_w , na ordem dos 0,826 a 0,797, não foi considerada significativamente diferente.

Tabela 11 - Características físico-químicas (pH e a_w) dos produtos testados.

Produto	Dia de análise	pH	a_w
SP	9 (n=3)	6,27 \pm 0,10	0,892 \pm 0,01
	38 (n=3)	5,86 \pm 0,12	0,838 \pm 0,03
	72 (n=3)	5,79 \pm 0,08	0,799 \pm 0,00
FP	9 (n=3)	5,91 \pm 0,29	0,826 \pm 0,03
	38 (n=3)	5,41 \pm 0,08	0,797 \pm 0,00
	72 (n=3)	5,37 \pm 0,07	0,800 \pm 0,00

Legenda: Os valores apresentados representam a média e o respetivo desvio-padrão dos valores obtidos em cada dia de análise.

De acordo com os resultados obtidos no parâmetro a_w , estes produtos seriam classificados como não suscetíveis de permitir a proliferação de *Listeria monocytogenes*, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005, dado que, os resultados de a_w estão abaixo dos valores de a_w que permitem a multiplicação de *Listeria monocytogenes* ($a_w \leq 0,92$) nos dois produtos. Contudo, a EFSA (EFSA BIOHAZ, 2018) refere que têm sido repetidamente relatadas amostras positivas de *Listeria monocytogenes* de produtos alimentares com baixa atividade de água (a_w). Neste relatório é também referido que a resposta de *Listeria monocytogenes* a diferentes condições de temperatura, pH, a_w e NaCl e concentrações de lactato de sódio mostra ser dependente da estirpe.

Segundo Burgess *et al* (2016), parte da capacidade dos agentes patógenos sobreviverem em alimentos está associada à capacidade de suportar o stress osmótico causado pela dessecação. A bactéria *Listeria monocytogenes* tem sido frequentemente isolada de ambientes que são expostos a baixa humidade, como superfícies de equipamentos e solo e, mais esporadicamente, têm sido relatadas amostras positivas de *Listeria monocytogenes* em produtos alimentares com baixos valores de a_w , como salsichas curadas, nozes, leite em pó e peixe seco (Burgess *et al*, 2016). Existem informações limitadas sobre a tolerância à desidratação de *Listeria monocytogenes* em comparação com outros patógenos veiculados por alimentos (Burgess *et al*, 2016).

Segundo Uyttendaele *et al* (2009), existem dois fatores que têm especial influência no potencial de multiplicação de *Listeria monocytogenes* nos produtos cárnicos cozidos: o a_w e a presença de CO₂ na atmosfera de embalagem. Por exemplo, em estudos realizados com patê de carne com valores de a_w entre 0,93–0,94, foi registado uma multiplicação de *Listeria*

monocytogenes de 0,5-1,0 log em 42 dias; sendo que, se a a_w for de 0,96-0,97, foi registrada uma multiplicação de 5 log em 42 dias (Uyttendaele *et al*, 2009).

Em estudos semelhantes com produtos cárneos prontos a consumir verificou-se também que mesmo em produtos alimentares com baixos valores de a_w ($a_w \leq 0,92$), observou-se presença de *Listeria monocytogenes* no final da vida útil em testes de desafio (Daskalov, 2013).

3.3.3. Características microbiológicas dos produtos testados

Ao longo do tempo em que os produtos inoculados com *Listeria monocytogenes* foram colocados em condições de desafio, foram também analisados, num grupo de amostras controlo e também nas amostras inoculadas, os grupos indicadores que caracterizam a contaminação geral dos produtos que foram fatiados e a sua deterioração em condições de embalagem anaeróbia, pelo que, foram escolhidos os grupos aeróbios totais a 30°C e as bactérias ácido lácticas.

Os resultados microbiológicos relativos à contagem microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C e bactérias ácido lácticas (BAL) no produto salsichão de peru com alho (SP) ao longo do teste de desafio estão espelhados na figura 10.

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C, nas amostras não inoculadas ou amostras controlo do produto SP apresentaram, no dia 0 dos testes de desafio, valores médios ($n=3$) de 3,7 log ufc/g. No dia 15, observou-se valores de 8,4 log ufc/g, revelando um grande aumento deste grupo nos primeiros quinze dias de armazenamento. Nos dias 30, 60 e 72 de armazenamento, observaram-se valores próximos de 8 log ufc/g, ou seja, a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C manteve-se constante no produto até ao final do período previamente definido como período de vida útil do produto.

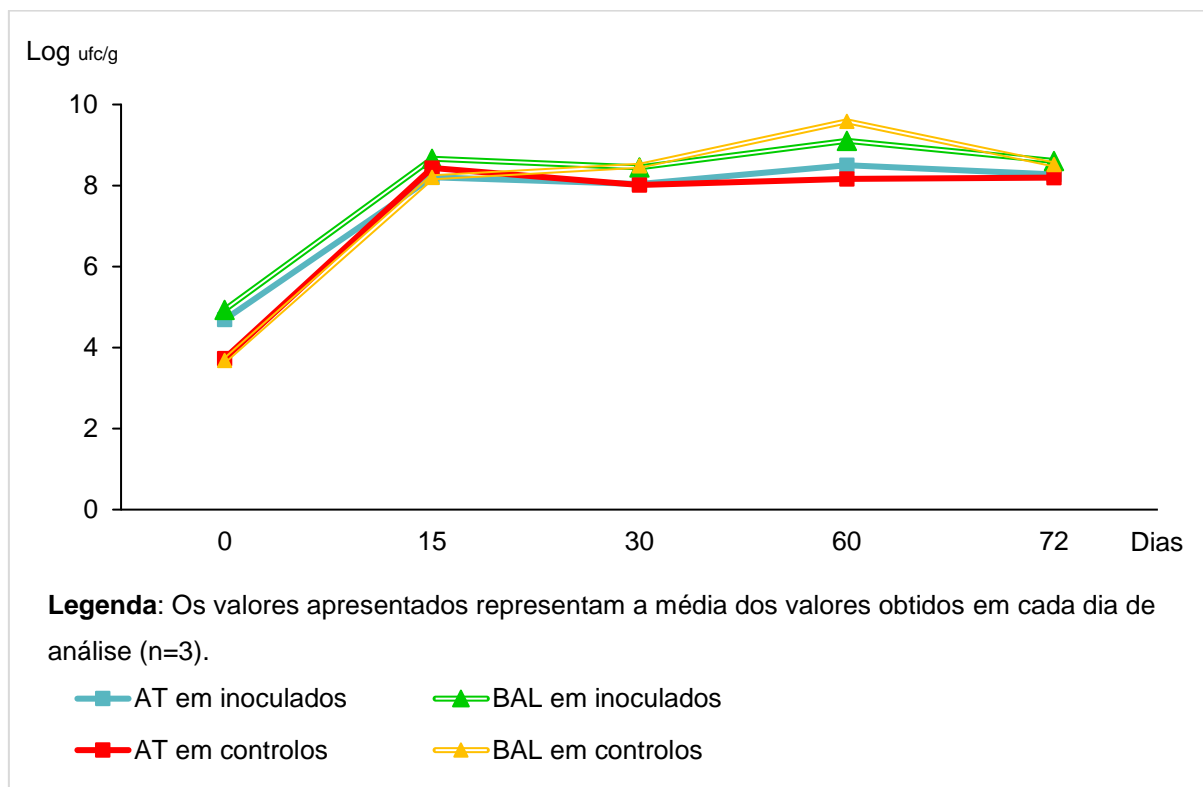
As amostras inoculadas do produto SP, no dia 0, apresentaram contagens de microrganismos totais a 30°C de 4,7 log ufc/g. Este valor é superior em 1 log ufc/g aos valores apresentados nas amostras não inoculadas. Nestas amostras observou-se igualmente uma aumento da contagem deste grupo até aos 8 log ufc/g nos primeiros 15 dias mantendo-se estes valores constantes até ao final da vida útil do produto (dias de análise 30, 60 e 72).

A contagem de bactérias ácido lácticas nas amostras não inoculadas do produto SP apresentaram, no dia 0, valores médios ($n=3$) de contagens próximos de 3,7 log ufc/g. A evolução das contagem de bactérias ácido lácticas nos primeiros quinze dias foi idêntica à observada no grupo dos microrganismos aeróbios totais a 30°C. Após 30 dias nas condições de desafio, as amostras apresentaram contagem de bactérias ácido lácticas próximas de 8,5 log ufc/g, com um ligeiro aumento entre os dias 30 e 60 até aos 9,5 ufc/g, enquanto que após 72 dias voltaram a observar-se valores de 8,5 log ufc/g.

Nas amostras inoculadas do produto SP registaram-se, no dia 0 dos testes de desafio, valores médios ($n=3$) de contagens de bactérias ácido lácticas próximos de 5 log ufc/g. Este valor é também superior em, aproximadamente, 1 log ufc/g aos valores apresentados de contagem

de bactérias ácido lácticas nas amostras não inoculadas. Também foi observado um aumento da população bacteriana até aos 8,7 log ufc/g nos primeiros 15 dias dos testes de desafio. No dia 30 dos testes de desafio, observaram-se valores próximos de 8,5 log ufc/g, ou seja, as bactérias ácido lácticas mantiveram-se constantes entre os dias 15 e 30 dos testes de desafio. Após 60 dias, nas amostras inoculadas, contaram-se 9 log ufc de bactérias ácido lácticas/g, voltando a observar-se valores médios de 8,5 log ufc/g aos 72 dias.

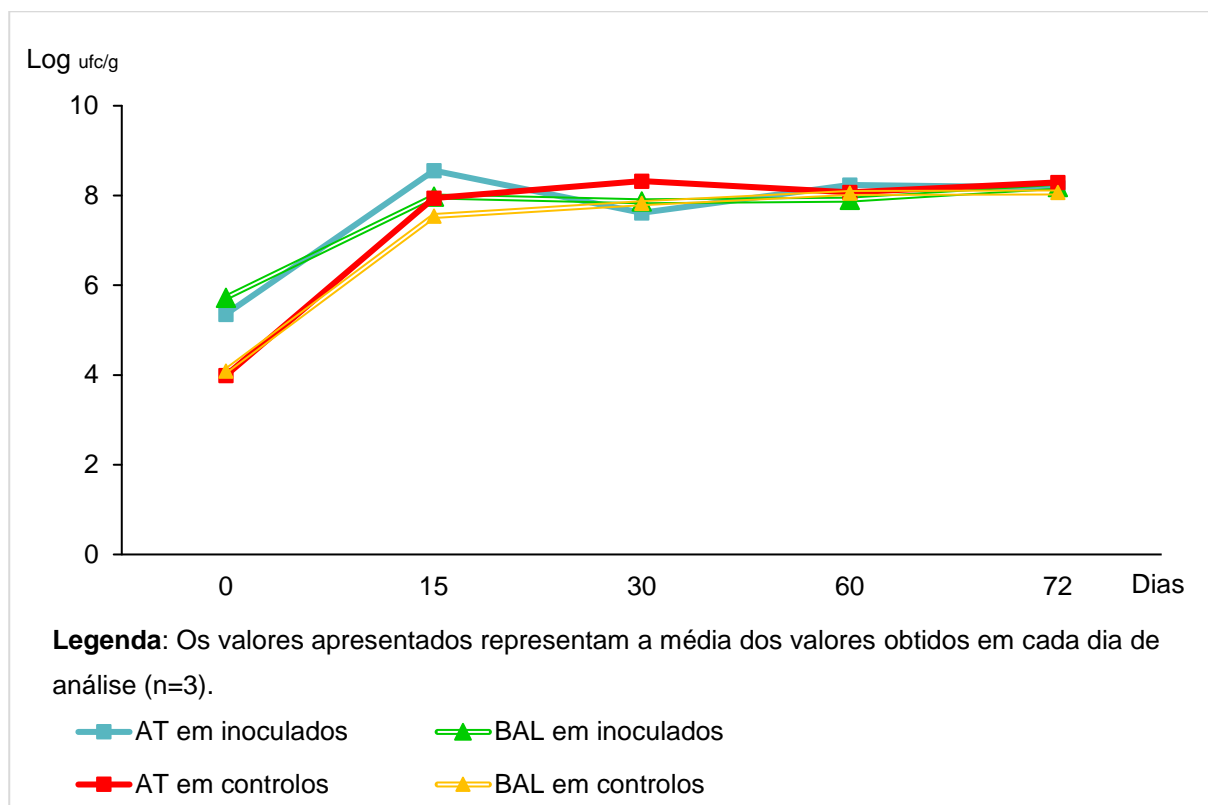
Figura 10 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e bactérias ácido lácticas no produto Salsichão de peru com alho (SP) durante os testes de desafio.



Os resultados microbiológicos relativos à contagem microrganismos aeróbios totais (AT) a 30°C e bactérias ácido lácticas (BAL) no produto fiambre magro de peru (FP) ao longo do teste de desafio estão espelhados na figura 11.

A contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C nas amostras não inoculadas ou amostras controlo do produto FP apresentaram, no dia 0, valores médios de 4 log ufc/g. Após 15 dias em condições de desafio, ocorreu um grande aumento de microrganismos aeróbios totais a 30°C, observando-se valores de aproximadamente 8 log ufc/g. Este grupo apresentou uma contagem constante até ao fim da vida útil do produto.

Figura 11 - Contagem de microrganismos totais a 30°C e de bactérias ácido lácticas no produto Fiambre magro de peru (FP) durante os testes de desafio.



Nas amostras produto FP inoculadas registou-se, no dia 0 contagens de microrganismos totais a 30°C de 5,35 log ufc/g. Este valor é superior em aproximadamente 1,5 log ufc/g aos valores apresentados nas amostras não inoculadas. Nos primeiros 15 dias também foi observado um aumento da contagem bacteriana até aos 8,5 log ufc/g, mantendo-se constante nos 8 log ufc/g até ao final da vida útil do produto (dias de análise 30, 60 e 72).

A contagem de bactérias ácido lácticas nas amostras controlo do produto FP apresentaram, no dia 0 dos testes de desafio, valores médios (n=3) de 4 log ufc/g. Este grupo revelou um grande aumento tal como se tinha observado com os microrganismos totais, nos primeiros quinze dias atingindo valores de 7,5 log ufc/g. As contagens de bactérias ácido lácticas nas amostras não inoculadas mantiveram-se constantes e próximas de 8 ufc/g até ao final da vida útil do produto (dia de análise 30, 60 e 72).

Nas amostras inoculadas do produto FP registaram-se, no dia 0 dos testes de desafio, valores médios (n=3) de contagens de bactérias ácido lácticas de 5,72 log ufc/g. Este valor é também superior, em 2 log ufc/g, aos valores apresentados de contagem de bactérias ácido lácticas nas amostras não inoculadas, tal como aconteceu nas contagens de microrganismos totais a 30°C. Após se registar aos 15 dias um aumento da contagem até aos 8 log ufc/g este grupo manteve-se constante até ao final do período de análise (30, 60 e 72 dias).

É importante referir que a diferença, no dia 0 (dia de inoculação das amostras) do teste de desafio, entre as contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C e de bactérias ácido

láticas relativamente às amostras inoculadas e não inoculadas, nos dois produtos, poderá dever-se ao facto de os meios utilizados (TGE agar e MRS) para realizar estas duas contagens de microrganismos não serem seletivos (TGE) ou suficientemente seletivos (MRS) e a bactéria *Listeria monocytogenes* (inoculada) ter a capacidade de se multiplicar nos meios de cultura em questão, tal como descrito por Gunes Altuntas *et al.* (2012) e Schillinger, Kaya & Lücke (1991).

Tanto o produto salsichão de peru (SP) como o produto fiambre de peru (FP) apresentaram uma elevada contagem de microrganismos totais a 30°C e bactérias ácido lácticas. É importante lembrar também que os produtos se encontravam armazenados em embalagens com atmosfera protetora constituída por CO₂ e N₂, sendo que pode ter existido um favorecimento de desenvolvimento de bactérias anaeróbias, mais especificamente bactérias ácido-láticas, o que levou a que as contagens fossem tão elevadas (Rossaint *et al.*, 2015). Os dados históricos da empresa produtora destes prontos a consumir foram consultados e estas contagens elevadas de microrganismos totais a 30°C e de bactérias ácido-láticas sempre existiram. Tal como já discutido, as indústrias que exibem produtos com contagens elevadas de microrganismos totais a 30°C tem uma maior probabilidade de apresentarem *Listeria monocytogenes* nos produtos prontos a consumir (Henriques *et al.*, 2014).

3.3.4. Avaliação dos produtos estudados quanto à suscetibilidade de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes*

As amostras do produto salsichão de peru (SP) com alho e do produto fiambre de peru (FP) foram inoculadas com *Listeria monocytogenes* de forma a que os produtos apresentassem uma concentração inicial de aproximadamente 2 log ufc/g.

As contagens de *Listeria monocytogenes* efetuadas no dia 0 permitiram aferir qual a concentração real obtida nos produtos inoculados. Assim, o produto SP apresentou uma contaminação inicial (n=9) de 2,72 log ufc/g, ligeiramente acima do valor esperado.

Os resultados microbiológicos relativos à contagem de *Listeria monocytogenes* do produto salsichão de peru com alho (SP) ao longo do teste de desafio estão apresentados na figura 12. Após 15 dias, as amostras foram novamente analisadas e registaram-se contagens de *Listeria monocytogenes* (n=9) de 2,88 log ufc/g. As contagens de *Listeria monocytogenes* aos 30, 60 e 72 dias (n=9) mantiveram-se constantes.

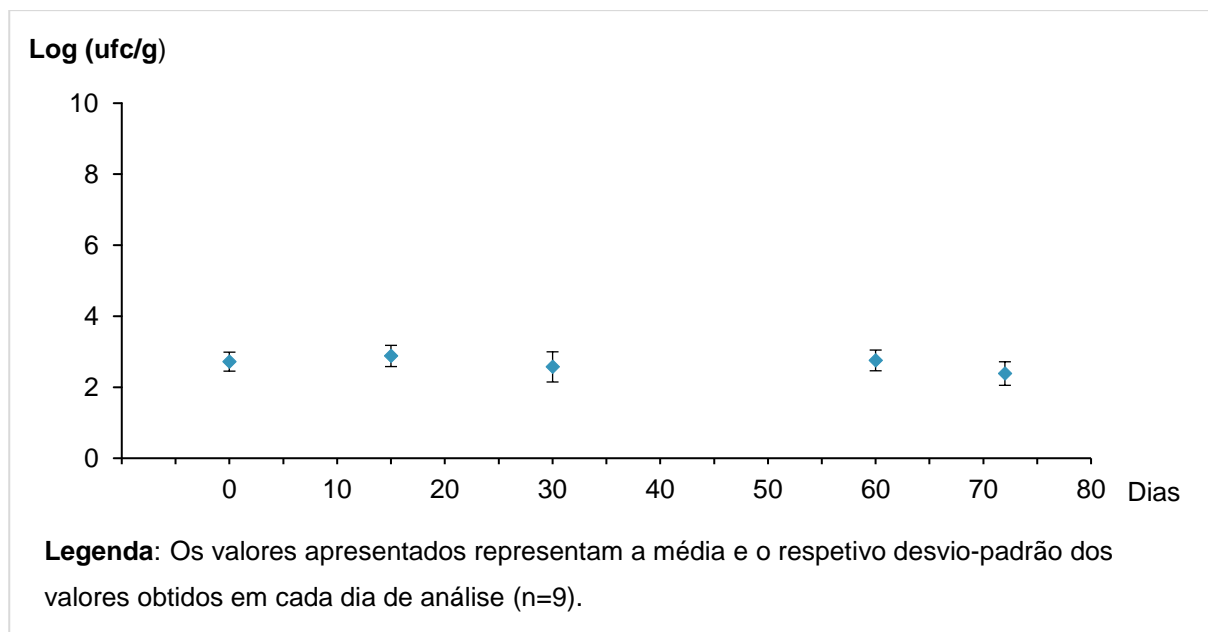
As contagens de *Listeria monocytogenes* registadas durante os testes de desafio com o produto SP foram entre os 2,39 e 2,88 log ufc/g, tal como se observa na figura 12, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas.

Nas amostras não inoculadas ou controlo do produto SP (n=45), ao longo de todo o teste de desafio, não se detetou presença de *Listeria monocytogenes*.

O potencial de crescimento da população bacteriana de *Listeria monocytogenes* (δ) do produto SP foi -0,33 log ufc/g, sendo, que este produto foi então classificado como não capaz

de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes* por ter um potencial de crescimento inferior a 0,5 log ufc/g (Beaufort *et al.*, 2014).

Figura 12 - Contagem de *Listeria monocytogenes* no produto Salsichão de peru com alho (SP) durante os testes de desafio.



Os resultados microbiológicos relativos à pesquisa e contagem de *Listeria monocytogenes* do produto fiambre magro de peru (FP) ao longo do teste de desafio estão demonstrados na figura 15.

No dia 0, no produto FP observou-se uma contagem de *Listeria monocytogenes* (n=9) de 2,78 log ufc/g, ligeiramente acima do valor esperado, tal como no produto SP. Após 15 dias, as amostras foram novamente analisadas e registou-se contagens de *Listeria monocytogenes* com valores médios (n=9) de 3,83 log ufc/g, ou seja, após 15 dias da inoculação houve uma multiplicação na ordem dos 1 log ufc/g de *Listeria monocytogenes* no produto. Ao dia 30 dos testes de desafio no produto FP, observou-se valores médios (n=9) de 3,83 ufc/g revelando que entre o dia 15 e o dia 30, não houve aumento da concentração de *Listeria monocytogenes* no produto. No dia 60, foram observados valores médios (n=9) de 3,51 ufc/g e no último dia dos testes de desafio (dia 72) observou-se valores médios (n=9) de 3,77 ufc/g.

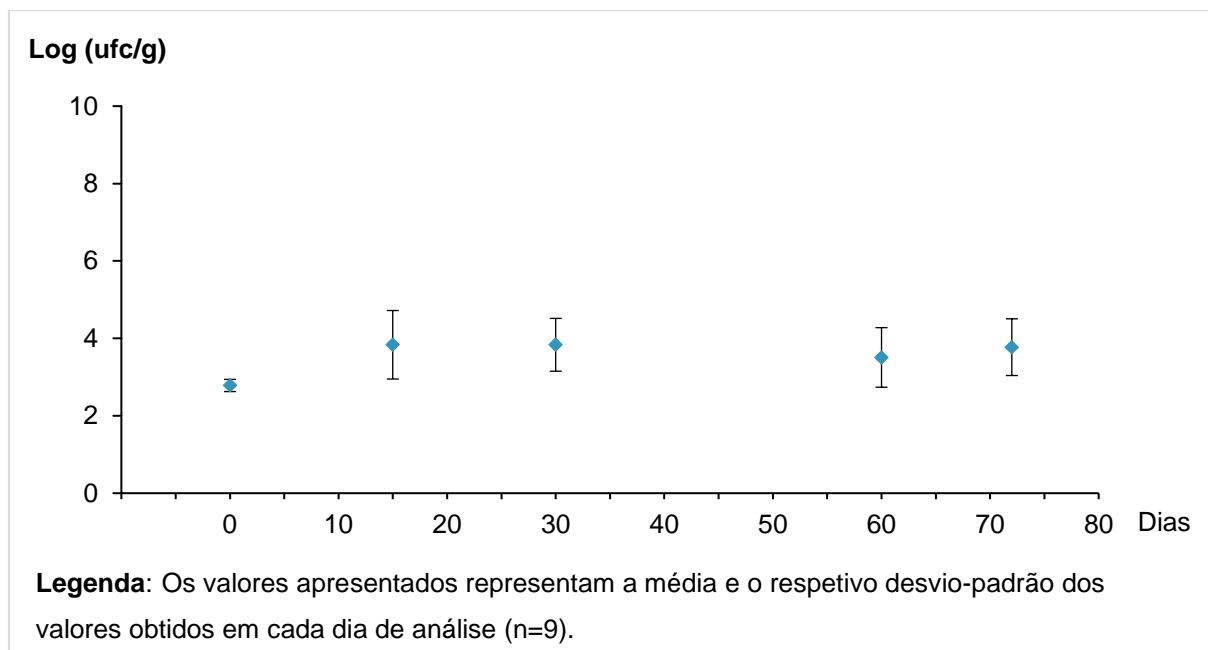
A contagem de *Listeria monocytogenes* no produto FP, nas amostras inoculadas, revelou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) entre o dia 0 e o dia 30 dos testes de desafio, estabilizando depois deste dia. Os valores observados durante os testes de desafio estiveram sempre entre os 2,78 e 3,83 log ufc/g.

Nas amostras não inoculadas ou controlo do produto FP (n=45) não se detetou, ao longo de todo o teste de desafio, a presença de *Listeria monocytogenes*.

O potencial de crescimento da população bacteriana de *Listeria monocytogenes* (δ) do produto FP foi 0,99 log ufc/g, sendo este produto então classificado como capaz de suportar

a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, por ter um potencial de crescimento igual ou superior a 0,5 log ufc/g (Beaufort *et al.*, 2014).

Figura 13 - Contagem de *Listeria monocytogenes* no produto Fiambre de peru (FP) durante os testes de desafio.



O potencial de crescimento da população de *Listeria monocytogenes* (δ) do produto FP foi 0,99 log ufc/g, determinando assim que este produto é um produto suscetível de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Assim sendo, este valor pode ser utilizado para estimar qual a concentração inicial do agente patogénico que pode existir no início da vida útil do produto para respeitar o limite de 100 ufc/g (ou 2 log ufc/g) no final da vida do produto, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005, pela seguinte fórmula:

$$[\text{Concentração inicial de } L. monocytogenes] = 2 \log - \delta$$

Assim sendo, a concentração inicial máxima que o produto FP pode conter, no início da sua vida útil e antes de ser colocado no mercado, de modo a respeitar o limite do critério microbiológico, é 1,01 log ufc/g (aproximadamente 10 ufc/g).

Os resultados da taxa de crescimento máxima (μ_{\max}) da população de *Listeria monocytogenes* dos dois produtos estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 – Taxa de crescimento máxima da população de *Listeria monocytogenes* (log ufc/dia) ao longo do teste de desafio.

Produto	$\Delta y_{0-15} / \Delta t_{0-15}$	$\Delta y_{15-30} / \Delta t_{15-30}$	$\Delta y_{30-60} / \Delta t_{30-60}$	$\Delta y_{60-72} / \Delta t_{60-72}$
SP	0,01	-0,03	0,01	-0,03
FP	0,08	0,00	-0,01	0,02

Legenda: $\Delta y_{a-b} / \Delta t_{a-b}$ = diferença na concentração (y) de *Listeria monocytogenes* (log ufc/g) em dois dias de análise (a e b) divididos pelo tempo (t), em dias, entre a e b; SP= salsichão de peru com alho; FP= fiambre magro de peru.

A taxa de crescimento máximo (μ_{\max}) de *Listeria monocytogenes* para o produto SP foi 0,01 log ufc/dia e ocorreu entre os dias de análise 0 a 15 e os dias 30 a 60 (Tabela 12).

Para o produto FP a taxa de crescimento máximo (μ_{\max}) calculada foi 0,08 log ufc/dia e ocorreu também entre os dias de análise 0 a 15 (Tabela 12).

Estes resultados demonstram que a primeira quinzena da vida útil destes produtos é importante, na medida em que foi nesta quinzena que se observou maior multiplicação de *Listeria monocytogenes* nos dois produtos.

As retas de regressão de concentração de *Listeria monocytogenes* sobre o tempo e respectivos valores de r^2 dos dois produtos estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Reta de regressão dos produtos testados e valores de r^2 .

Produto	Reta de regressão	R^2
SP	$y = -0,0005x^2 + 0,0455x + 2,9593$	0,1634
FP	$y = -0,00003x^2 - 0,0013x + 2,7494$	0,0528

Estes valores de r^2 demonstram que grande parte dos resultados obtidos em termos de concentração de *Listeria monocytogenes* nas amostras não podem ser explicados pelos modelos de regressão exibidos.

3.4. Discussão geral dos resultados dos testes de desafio

Os produtos de salsicharia de carne de aves utilizados em teste de desafio foram fatiados, inoculados com *Listeria monocytogenes* e embalados em embalagem protetora com uma mistura de azoto e dióxido de carbono, sendo colocados a 7°C durante 72 dias. Estes produtos apresentaram valores de a_w inferiores a 0,92 ao longo do tempo dos testes de desafio e valores iniciais de pH entre 6,27 (SP) e 5,91 (FP), observando-se um decréscimo ao longo do tempo. A atividade de água (a_w) destes produtos surge como fator de controlo da multiplicação de *Listeria monocytogenes*, de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005.

Verificou-se também que a contagem de microrganismos aeróbios totais e bactérias ácido-lácticas foi elevada em ambos os produtos fatiados e embalados. Este facto, sugere que as bactérias ácidas lácticas são dominantes nestes produtos, podendo surgir como outro fator inibitório da multiplicação da bactéria *Listeria monocytogenes* nos produtos estudados (Bredholt *et al.*, 2001; Vermeiren *et al.*, 2006; Maragkoudakis *et al.*, 2009; Sakaridis *et al.*, 2012).

Apesar de, na revisão bibliográfica, serem referidos casos de inibição da proliferação de *Listeria monocytogenes* pela presença de bactérias ácido lácticas, neste trabalho experimental não foi possível obter nenhuma evidência, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), da interação entre o grupo de bactérias do ácido láctico e *Listeria monocytogenes*. Foi na primeira quinzena da vida útil destes produtos que se registou a maior multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Posteriormente a esta data, ocorre inibição da multiplicação, sendo que, o controlo da multiplicação de *Listeria monocytogenes* pode estar relacionado com o aumento de contagens de bactérias ácido lácticas a partir do 15º dia e a produção de ácido com ligeira diminuição de pH dos produtos, juntamente com os baixos valores de a_w registados nestes produtos.

No entanto, mesmo com valores altos de contagens de bactérias ácido lácticas e com um a_w abaixo dos valores de a_w que permitem a multiplicação de *Listeria monocytogenes* ($a_w \leq 0,92$), o produto FP suportou a multiplicação de *Listeria monocytogenes*.

Na bibliografia consultada também foram encontrados diversos estudos em que a a_w dos produtos era inferior a 0,92 e verificou-se multiplicação de *Listeria monocytogenes* nos mesmos (Uyttendaele *et al.*, 2009; Daskalov, 2013; Burgess *et al.*, 2016; EFSA BIOHAZ, 2018). Segundo Burgess *et al.* (2016), têm sido relatadas cada vez mais amostras positivas de *Listeria monocytogenes* em produtos alimentares com baixos valores de a_w , como salsichas curadas, nozes, leite em pó e peixe seco. De acordo com o relatório da EFSA BIOHAZ (2018), a resposta de *Listeria monocytogenes* a diferentes condições de temperatura, pH, a_w e NaCl e concentrações de lactato de sódio mostra ser dependente da estirpe utilizada, sendo que foi importante neste trabalho a utilização de estirpes presentes na indústria que produz os produtos que foram expostos aos testes de desafio.

No caso do produto FP, poderão ser aplicados limites de contagem de *Listeria monocytogenes* internos (limite de 10 ufc/g de *Listeria monocytogenes*), antes do produto ser colocado no mercado, de forma a que o produto não exceda o limite de 100 ufc/g (ou 2 log ufc/g) no final da vida útil (Regulamento (CE) nº 2073/2005), desde que a autoridade competente assim o autorize.

Durante este trabalho experimental, é importante também referir que não foi detetada presença de *Listeria monocytogenes* em nenhum dos produtos prontos a consumir não inoculados (amostras controlo), sendo analisadas cerca de 45 amostras controlo de cada produto, verificando-se assim que este produto não se encontrava contaminado.

É importante também referir que em nenhuma das amostras de superfícies analisadas recolhidas na zona de alto risco, onde este produto foi fatiado e embalado, após tratamento térmico, foi detetada presença de *Listeria monocytogenes*, reforçando que as medidas de prevenção de contaminação cruzada aplicadas, como por exemplo, a utilização de farda descartável e a obrigatoriedade de lavagem de mãos para entrada nesta zona, são de extrema importância no controlo do agente patogénico. Foram analisadas 9 superfícies, por onde circulam diariamente produtos prontos a consumir, em tempos diferentes durante três dias de produção, com uma área de cerca de 1000 cm² cada uma. Segundo Iranzo *et al.* (2015), a presença de *Listeria monocytogenes* no produto final tem a sua origem, em grande parte, na matéria-prima que é utilizada, sendo importante todas as medidas de prevenção da contaminação cruzada, através das superfícies de contacto, da matéria-prima contaminada com o produto acabado pronto a consumir.

Apesar de serem registados valores de contagens elevados de microrganismos totais a 30°C nos produtos produzidos, o que segundo Henriques *et al.* (2014), revela uma maior probabilidade de apresentarem *Listeria monocytogenes*, no trabalho experimental desenvolvido verificou-se, tal como descrito, que tanto nas amostras não inoculadas como nas superfícies de contacto na área de alto risco, não foi detetada a bactéria *Listeria monocytogenes*, apesar de ter sido detetada a presença da bactéria nas matérias-primas (maior fonte de contaminação). Foi assim validado, através dos resultados obtidos neste trabalho experimental, que as medidas de prevenção da contaminação cruzada, medidas de higiene e boas práticas e plano HACCP, em prática na altura da realização do trabalho experimental e recolha de amostras de produtos, foram eficazes.

Este estudo veio assim demonstrar que os produtos prontos a consumir salsichão de peru com alho e fiambre de peru, produzidos nas condições descritas, têm fatores limitativos na sua constituição que permitem que exista um controlo na multiplicação do agente patogénico *Listeria monocytogenes* durante a vida útil dos mesmos e não seja excedido o limite de 100 ufc/g até ao termo da vida útil dos produtos.

4. Conclusão

Os estudos desenvolvidos nesta dissertação de mestrado tinham como objetivo verificar a capacidade de dois produtos suportarem ou não a multiplicação de *Listeria monocytogenes* durante o seu período de vida útil.

Ao analisar os resultados obtidos na caracterização físico-química dos produtos estudados, e de acordo com o Regulamento (CE) nº 2073/2005, estes produtos seriam classificados como incapazes de permitir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. No entanto, não é isso que se verifica, sendo que um dos produtos permite a multiplicação de *Listeria monocytogenes* ao longo do período de vida útil.

Os produtos estudados apresentaram uma elevada contagem de microrganismos totais a 30°C e bactérias ácido lácticas. No entanto, não foi verificada presença de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras não inoculadas (n=45) de cada produto, revelando assim que as boas práticas de higiene e de laboração e as medidas de prevenção da contaminação cruzada na indústria produtora estão a ser cumpridas e são eficazes. Uma contagem alta de bactérias ácido lácticas é indicadora também que estes microrganismos são dominantes nestes produtos e este facto pode ser uma das razões para a multiplicação de *Listeria monocytogenes* ter sido “limitada”. No entanto, neste trabalho experimental, não foi possível obter nenhuma evidência estatisticamente significativa, da interação ou sinergias entre *Listeria monocytogenes* e bactérias ácido lácticas .

Em relação à capacidade de suportar a multiplicação de *Listeria monocytogenes* durante o período de vida útil, o produto salsichão de peru com alho não permite a sua multiplicação, no entanto o produto fiambre magro de peru permite a multiplicação de *Listeria monocytogenes*. Este estudo veio assim demonstrar que os produtos prontos a consumir salsichão de peru com alho e fiambre de peru, produzidos nas condições descritas, têm fatores limitativos na sua constituição, como a_w , pH e a presença de bactérias ácido lácticas, entre outros, que eventualmente permitem que exista um controlo na multiplicação de *Listeria monocytogenes*, nas estirpes patogénicas presentes na indústria que os produz e que não seja excedido o limite de 100 ufc/g até ao termo da vida útil dos produtos.

Em relação a estes produtos, e desde que a autoridade competente assim o autorize, os critérios aplicáveis em relação ao controlo de *Listeria monocytogenes* destes produtos prontos a consumir poderão ser definidos no ponto 1.3 do capítulo 1, do anexo I do Regulamento (CE) nº 2073/2005, que define que o limite aplicável para estes produtos é 100 ufc/g para produtos colocados no mercado.

Apesar desta conclusão, no produto fiambre magro de peru, e de acordo com os resultados obtidos no tratamento aos dados recolhidos neste estudo, é recomendável o estabelecimento de limites internos de controlo, para a presença de *Listeria monocytogenes* no início da vida útil do produto antes da sua introdução no mercado, desde que devidamente evidenciados e

aprovados pelas autoridades competentes, tal como previsto no Regulamento (CE) nº 2073/2005.

Como sugestão de estudo a desenvolver na indústria descrita, seria relevante apresentar e explorar as bactérias ácido lácticas que estão naturalmente presentes, tal como verificado, e em grandes quantidades, nos produtos produzidos. Poderá ser importante perceber qual a origem destas bactérias, se são introduzidas através de uma matéria-prima ou ingrediente ou estão presentes naturalmente no ambiente da unidade, através de biofilmes, e estudar também qual a sua presença em todos os produtos e se esta presença é contínua (se todos os produtos apresentam contagens elevadas) ou se é, por exemplo, uma questão pontual (alguns produtos produzidos num certo equipamento ou produtos produzidos só em alguns meses do ano, por exemplo). Poderá ser testado também a interação desta cultura de bactérias ácido lácticas contra outros agentes patogénicos, como por exemplo, *Salmonella spp.* ou *E. coli*.

Outro estudo a realizar, se detetada a presença de *Listeria monocytogenes* em superfícies ou produtos prontos a consumir dentro da zona de alto risco, é a caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de *Listeria monocytogenes*, com o objetivo de identificar possíveis fontes e vias de contaminação cruzada. As boas práticas de higiene e laboração verificadas durante a realização do estágio e do trabalho experimental, bem como o esforço para a prevenção da contaminação cruzada deverão ser mantidos para que este caso não se verifique.

Outro ponto que deverá ser alvo de estudo, e tal como referido por Henriques (2016), é a realização de validações dos procedimentos de higiene contra os agentes patogénicos presentes naturalmente na matéria-prima da indústria em questão e a realização de avaliação microbiológica das superfícies e produtos aquando da realização de auditorias dos sistemas de gestão da segurança dos alimentos implementados.

Parte IV: Referências bibliográficas

- Afonso, A. (2006). Prevenir os acidentes alimentares. *Segurança e qualidade alimentar*, 1, 12–15. Acedido em 20 de Janeiro de 2018, disponível em <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-01/n01-pg12-15.pdf>
- Allerberger, F., & Wagner, M. (2010). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(1), 16–23. Acedido em Janeiro 10, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03109.x>
- Araújo, M. (2007). Safety e Security: Conceitos diferentes. *Segurança E Qualidade Alimentar*, 3, 62–63. Acedido em Janeiro, 3, 2017, disponível em <http://www.infoqualidade.net/SEQUALI/PDF-SEQUALI-03/Page 62-63.pdf>
- Beaufort, A. (2011). The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22(9), 1498–1502. Acedido em Maio, 15, 2016, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.07.014>
- Beaufort, A., Cornu, M., Bergis, H., Lardeux, A.L., & Lombard, B. (2014). *Technical guidance document on shelf-life studies for Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*. Version 3. European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* - Anses-Food Safety Laboratory. Acedido em Novembro, 3 de 2014, disponível em: [http://www.fsai.ie/uploadedFiles/UERL%20lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20\(2\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/UERL%20lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf)
- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C. & Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 526–532.
- BioMérieux (2017). *Culture Media: Biofood*. Acedido em Fevereiro 19, 2018, disponível em <http://www.biomerieux-usa.com/industry/culture-media-biofood>
- Bortolussi, R. (2008). Listeriosis: a primer. *CMAJ*, 179, 4. Acedido em Fev. 19, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1503/cmaj.081377>
- Bredholt, S., Nesbakken, T. & Holck, A. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 66, 2001, Páginas 191-196. Acedido em Setembro 23, 2018, disponível em [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00519-5)
- British Retail Consortium (2015). *BRC Global Standard for Food Safety*, versão 7.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. Acedido em Fevereiro 19, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
- Burgess, C., Gianotti, A., Gruzdev, N., Holah, J., Knøchel, J., Lehner, A., Margas, E., Esser, S., Sela Saldinger, S. & Tresse, O. (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 221, 2016, Páginas 37-53, ISSN 0168-1605, Acedido em 22 de Setembro de 2018, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014>
- Cardoso, M. (2016). Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em géneros

alimentícios e o seu risco na população de grávidas. Acedido em Fevereiro 19, 2018, disponível em <http://blog.safemed.pt/avaliacao-da-incidencia-de-Listeria-monocytogenes-em-generos-alimenticios-e-o-seu-risco-na-populacao-de-gravidas/>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011a). Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with the Consumption of Hog Head Cheese Louisiana, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60 (13), 401-405. Acedido em Outubro 2017, disponível em http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6013a2.htm?s_cid=mm6013a2_w

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011b). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado*. Acedido em Janeiro, 2018, disponível em <http://www.cdc.gov/Listeria/outbreaks/cantaloupes-jensenfarms/120811/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2017). *Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)*. Acedido em Fevereiro, 15, 2017, disponível em <https://wwwn.cdc.gov/foodnetfast/>

Chaix, E. , Guillaume, C. & Guillard, V. (2014), Oxygen and Carbon Dioxide Solubility and Diffusivity in Solid Food Matrices: A Review of Past and Current Knowledge. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13: 261-286. Acedido em Fevereiro, 15, 2017, disponível em doi:10.1111/1541-4337.12058

Codex Alimentarius (2011) CAC/RCP 1 - 1969 (Correções editoriais em 2011). *Código Internacional Recomendado de Práticas - Princípios Gerais de Higiene Alimentar*. Acedido em 3 de Abril de 2017, disponível em http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-roxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCAC%2BRCP%2B1-1969%252FCXP_001e.pdf

Daskalov, H. (2013). Study on factors (pH, water activity, salt content) affecting the growth of *Listeria monocytogenes* in raw dried cured sausages. *Macedonian Veterinary Review*. 36. 91-95. Acedido em 22 de setembro de 2018, disponível em https://www.researchgate.net/publication/275041738_Study_on_factors_pH_water_activity_salt_content_affecting_the_growth_of_Listeria_Monocytogenes_in_raw_dried_cured_sausages

Decreto-Lei nº 67/98, de 18 de Março de 1998. *Diário da República*, 65/1998.

Decreto-Lei nº 113/2006 de 12 de Junho de 2006. *Diário da República*, 113/2006.

Den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S. & other authors (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, 1882–1889.

Despacho nº 5681-A/2014 de 29 de Abril de 2014. *Diário da República*, nº 82/2014.

Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (2017). *Lista de biocidas de uso veterinário autorizados*. Atualização de Dezembro de 2017.

Diretiva nº 93/43/CEE do Conselho, de 14 de Junho de 1993, relativa à higiene dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial Da União Europeia*

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical*

Microbiology, 42(8), 3819–3822. Acedido em Fevereiro 21, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819>

European Food Safety Authority and European Center for Disease Prevention and Control (EFSA & ECDC) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12). Acedido em Fevereiro 21, 2018, disponível em <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, Girones R, Herman L, Koutsoumanis K, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Takkinen J, Wagner M, Arcella D, Da Silva Felicio MT, Georgiadis M, Messens W and Lindqvist, R. (2018). Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* 2018;16(1):5134, 173 pp. Acedido em 22 de setembro de 2018, disponível em <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>

European Commission (2015). The Rapid Alert System for Food and Feed. *Annual report 2014*. European Commission. Acedido em 22 de setembro de 2018, disponível em <https://doi.org/10.2307/3395557>

European Commission (2016). Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). *Annual Report, 2015*. Acedido em 22 de setembro de 2018, disponível em https://doi.org/10.2875/112129_EW-AC-16-001-EN-N

European Commission (2017). *RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed - 2016 annual report*. <https://doi.org/10.2772/33031>

European Commission & Directorate General for Health and Consumer Affairs [CE/DG SANCO] (2008). *Guidance document on Listeria monocytogenes shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (CE) nº 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs*. Commission staff working document. Acedido em Setembro, 9 de 2014, disponível em http://www.fsai.ie/uploadedFiles/UE_Guidance_Listeria_monocytogenes.pdf

Everis, L. & Betts, G. (2013). Evaluation of *Listeria* challenge testing protocols: A practical study using cooked sliced ham. *Food Control*, 29 (2013) 61-65. Acedido em Setembro, 9 de 2014, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.010>

Food and Agriculture Organization (FAO) (1999). The importance of food quality and safety for developing countries. *Committee on World Food Security*. 25ª edição. Acedido em Agosto, 10, 2017, disponível em <http://www.fao.org/docrep/meeting/x1845e.htm>

Food and Agriculture Organization (FAO) (2001), *The State of Food Insecurity in the World*, 3ª edição. Acedido em Agosto, 10, 2017, disponível em <http://www.fao.org/docrep/003/y1500e/y1500e00.htm>

Food Safety Authority of Ireland (FSAI) (2006). *Guidance note no. 20: Industrial processing of heat-chill foods*. Dublin: Food Safety Authority of Ireland. Acedido em Agosto, 10, 2017, disponível em <https://www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=760>

Fox, E. M., Wall, P. G., & Fanning, S. (2015). Control of *Listeria* species food safety at a poultry food production facility. *Food Microbiology*, 51, 81–86.

Fraqueza, M. J., Ferreira, M. C., & Barreto, A. S. (2006). Comportamento de *Listeria monocytogenes* na carne de peru embalada em atmosfera modificada com misturas de

gases contendo argon ou monóxido de carbono. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano XIII n, 19–35.

Fretz, R., Pichler, J., Sagel, U., Much, P., Ruppitsch, W., Pietzka, A. T., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Appl, G., Werber, D., Stark, K., Prager, R., Flieger, A., Karpíšková, R., Pfaff, G. & Allerberger, F. (2010). Update: Multinational listeriosis outbreak due to 'Quargel', a sour milk curd cheese, caused by two different *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strains, 2009-2010. *Euro Surveillance*, 15 (16), 2-3. Acedido em Janeiro, 4, 2018, disponível em <http://eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V15N16/V15N16.pdf>

FSSC 22000 (2017). *Food Safety System Certification 22000*, versão 4.1. Acedido em Outubro, 6, 2017, disponível em <http://www.fssc22000.com/documents/standards/downloads.xml?lang=en>

Fundação Eroski (2007). *Barómetro de consumo 2007*. Acedido em Abril, 29, 2017, disponível em <http://barometro.fundacioneroski.es/2007/alimentos-y-percepcion-de-riesgo>

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Millilo, S. R., Den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. & Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1280–1288.

Gunes Altuntas, E., Kocan, D., Cosansu, S., Ayhan, K., Juneja, V. & Materon, L. (2012). Antibiotic and Bacteriocin Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Different Foods. *Food and Nutrition Sciences*. 3. 363-368. Acedido em 22 de Setembro de 2018, disponível em <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.33052>.

Henriques, A., Gama, L., & Fraqueza, M. (2014). Assessing *Listeria monocytogenes* presence in Portuguese ready-to-eat meat processing industries based on hygienic and safety audit. *Food Research International*, 63, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.035>

Henriques, A.R. (2016). *Listeria monocytogenes in the ready-to-eat meat-based food chain: characterization and preventive control measures assessment*. [abstract] [versão electrónica] Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa. <http://hdl.handle.net/10400.5/12749>

Henriques, A. R., & Fraqueza, M. J. (2017). Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.045>

Institute of Medicine and National Research Council (2010). Enhancing Food Safety: The Role of the Food and Drug Administration. *The National Academies Press*. Anexo D. Acedido em Setembro, 15, 201, disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK220402/#__NBK220402_dtls__

Iranzo, E., Navarro, R., Gascó, J., Carntón, F., & Cucart, A. (2015). *Listeria monocytogenes nas indústrias das carnes* (1ª edição). Betelgeux, S.L.

International Featured Standards (IFS) Food (2017). *International Featured Standards - IFS Food* - versão 6.1 (Novembro de 2017). Acedido em Janeiro, 17, 2018, disponível em https://www.ifs-certification.com/images/standards/ifs_food6_1/documents/standards/IFS_Food_V6_1_en.pdf

- International Standard ISO 11290-1:1996*. (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Standard ISO 11290-2:1996*. (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Standard ISO 15214* (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Standard ISO 4833* (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Standard ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004*. (2004). Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. International Organization for Standardization, Switzerland.
- International Standard ISO 11290-2:1996/Amd 1:2004*. (2004). Modification of the enumeration media. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Food and Drug Administration (FDA)* (2016). What You Need to Know About the FDA Regulation: Current Good Manufacturing Practice, Hazard Analysis, and Risk-Based Preventive Controls for Human Food (21 CFR Part 117): Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services - Center for Food Safety and Applied Nutrition. Acedido em Agosto 19, 2015, disponível em <https://www.fda.gov/downloads/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/ucm526507.pdf>
- Lang Halter, E., Neuhaus, K. & Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 641–647. Acedido em Agosto 20, 2018, disponível em <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.036830-0#tab1>
- Larsen, H. E. & Seeliger, H. P. R. (1966). A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In *Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis* 1994, pp. 35–39. Bilthoven, the Netherlands. Acedido em Agosto 20, 2018, disponível em <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/21/1/ijms-21-1-3.pdf?expires=1538003578&id=id&accname=guest&checksum=5432FDC287E4136379BE2AEA87C90196>
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A. D., Le Flèche-Mateós, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. & Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. I. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2210–2214. Acedido em Agosto 20, 2018, disponível em <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.017376-0>
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645–659. Acedido em Fevereiro 15, 2018, disponível em <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.46495-0>
- Lopes, M. (2013). *Surto de Listeria monocytogenes na Região de*

Lisboa e Vale do Tejo (2009-2015). Trabalho de Projecto de Investigação, Mestrado em Saúde Pública. Lisboa: Escola Nacional de Saúde Pública - Universidade Nova de Lisboa.

- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., Teixeira, P. (2014). Bacteria: *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of Food Safety*. Waltham, MA: Academic Press. 450-461. Acedido em Janeiro 5, 2018, disponível em <https://books.google.pt/books?id=mX1XAQAAQBAJ&pg=PA450&lpg=PA450&dq=Listeria+Murray,+Webb+e+Sawnn+em+1924&source=bl&ots=3t7lxDi0Mv&sig=ObmcfFAi3xg9lYMuMTmAm1uYk3Q&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwi27bbcg7XZAhUD6xQKHWc9B9IQ6AEIKjAA#v=onepage&q&f=false>
- Maragkoudakis, P., Mountzouris, K., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M., Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 130, Issue 3, 219-226. Acedido em Setembro, 23, 2018, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.027>.
- McLauchlin, J. & Low, J. C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. [abstract] [versão electrónica]. *Veterinary Record*, 135, 615-617. Acedido em Agosto 19, 2018, disponível em <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/135/26/615.abstract>
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, 7, 187. Acedido em Agosto, 10, 2015, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713596000382>
- McNeill, C., Sisson, W., & Jarrett, A. (2017). Listeriosis: A Resurfacing Menace. *The Journal for Nurse Practitioners*, 13(10), 647–654. Acedido em Fevereiro 20, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1016/J.NURPRA.2017.09.014>
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. a. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21(2), 213–216. Acedido em Fevereiro 15, 2018, disponível em [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00057-1)
- Mil-Homens, Sofia (2007). *HACCP*. Acedido em Janeiro, 15, 2017, disponível em <http://www.asae.gov.pt/pagina.aspx?back=1&codigono=54105579AAAAAAAAAAAAAAAAAA>
- Motsoaledi, Aaron (2018). *Media statement by the Minister of Health Dr Aaron Motsoaledi regarding the update on the Listeriosis outbreak in South Africa*. Department: Health. Republic of South Africa. Acedido em Março, 15, 2018, disponível em <http://www.nicd.ac.za/wp-content/uploads/2018/03/Update-on-Listeriosis-Press-Conference-Monday-04-March-2018-FINAL.pdf>
- Norma Portuguesa (NP) 1828 (1982). Microbiologia alimentar: Colheita de amostras para análise microbiológica. Direcção-Geral da Qualidade. Lisboa.
- Norma Portuguesa (NP) 1829 (1982). Microbiologia alimentar: Preparação da amostra para análise microbiológica. Direcção-Geral da Qualidade. Lisboa.
- Norma Portuguesa (NP) 2079 (1989). Microbiologia alimentar: Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.
- Norma Portuguesa (NP) 3005 (1985). Microbiologia alimentar: Preparação das diluições para

- análise microbiológica. Direcção-Geral da Qualidade. Lisboa.
- Norma Portuguesa (NP) 3441 (1990). Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do pH. Direcção-Geral da Qualidade. Lisboa.
- Nunez-Montero, K., Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Peraza, J., Pizarro-Cerda, J., & Lecuit, M. (2018). *Listeria costaricensis* sp. nov. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68: 844-850, Acedido em Agosto 1, 2018, disponível em doi: 10.1099/ijsem.0.002596
- Pirie, J. H. H. (1927). A new disease of veld rodents." Tiger River Disease". *S. Afr. Inst. Med.Res.* 3. Acedido em Abril 27, 2015, disponível em <http://www.bmj.com/content/2/3477/350.full.pdf>
- Pirie, J. H. H. (1940). *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria, *Nature*, 145, 264. Acedido em Abril 27, 2015, disponível em <http://www.nature.com.ep.fjernadgang.kb.dk/nature/journal/v145/n3668/abs/145264a0.html>
- Pita, J.S.M. (2012). *Surto de listeriose entre 2009 e 2015 em lisboa e vale do tejo -investigação e medidas implementadas pela asae*. Dissertação de mestrado em medicina veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Reis, I. F., Costa, A. M., & Teixeira, P. (2015). Avaliação da incidência de *Listeria monocytogenes* em géneros alimentícios e o seu risco na população de grávidas. *Riscos E Alimentos*, 10(Alimentação e Gravidez). Acedido em Abril 25, 2018, disponível em <http://blog.safemed.pt/avaliacao-da-incidencia-de-Listeria-monocytogenes-em-generos-alimenticios-e-o-seu-risco-na-populacao-de-gravidas/>
- Regulamento (UE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002 e suas alterações. *Jornal Oficial Da União Europeia*
- Regulamento (CE) nº 852/2004 da Comissão de 29 de Abril relativo à higiene dos géneros alimentícios e suas alterações. *Jornal Oficial da União Europeia*
- Regulamento (CE) nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios e suas alterações *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (UE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares e suas alterações. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios e suas alterações. *Jornal Oficial da União Europeia*.
- Rocourt, J. & Grimont, P.A.D. (1983). *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33, 866–869. Acedido em Abril 1, 2018, disponível em <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/33/4/ij-s-33-4-866.pdf?expires=1538004018&id=id&accname=guest&checksum=3B02ED1A6C0BD7D5F1D3161A2B368904>
- Rocourt, J. (1996). Risk factors for listeriosis. *Food Control*. 7, 195–20. Acedido em Fevereiro 21, 2018, disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713596000357>

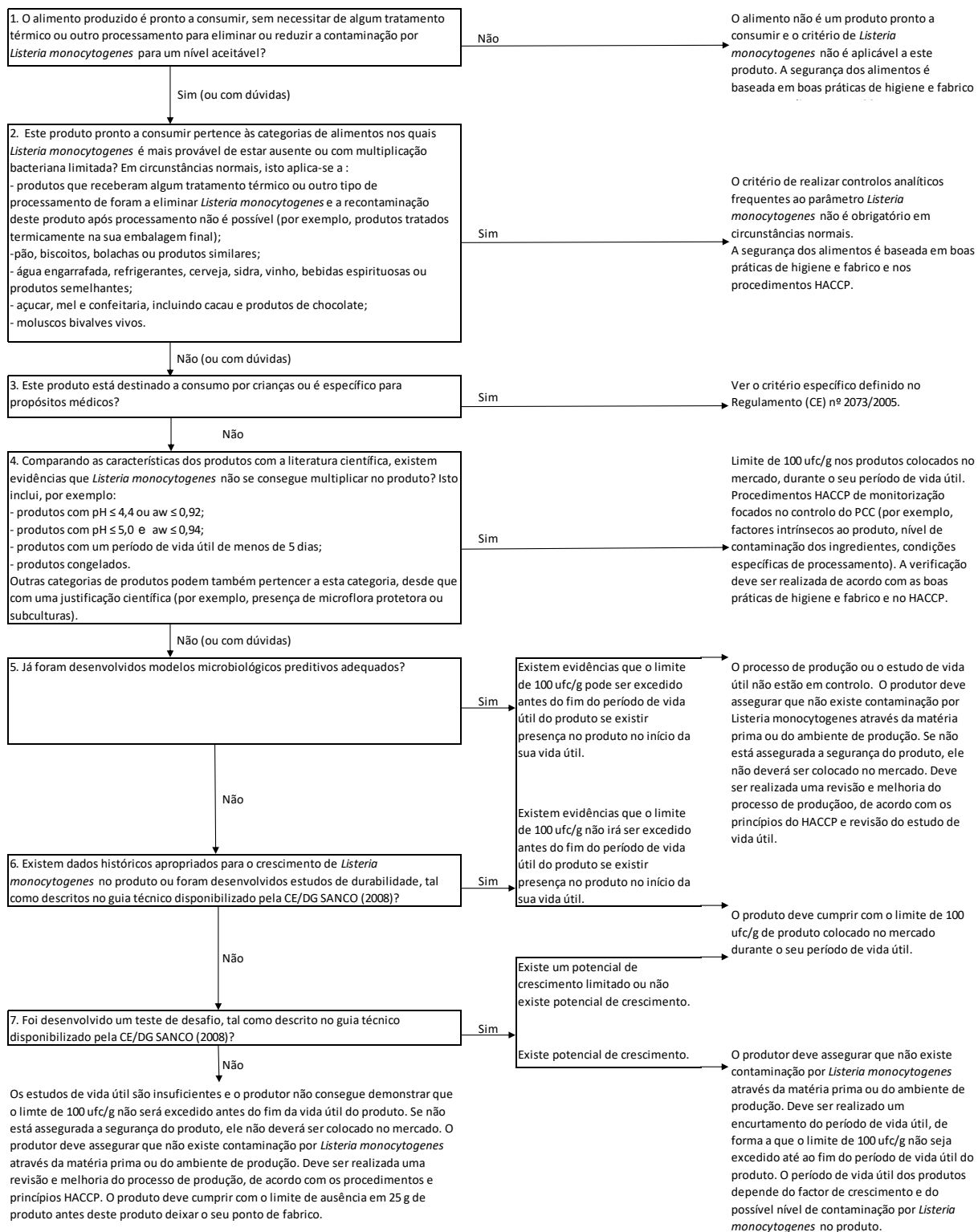
- Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007). The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In E. T. Ryser & E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. (283-304). New York: CRC Press. Acedido em Fevereiro 22, 2018, disponível em https://www.researchgate.net/publication/313751570_The_genus_Listeria_and_Listeria_monocytogenes_phylogenetic_position_taxonomy_and_identification
- Rossaint, S., Klausmann, S. & Kreyenschmidt, J. (2015). Effect of high-oxygen and oxygen-free modified atmosphere packaging on the spoilage process of poultry breast fillets, *Poultry Science*, Volume 94, Issue 1, 1 January 2015, Páginas 93–103, Acedido em Setembro 12, 2018, disponível em <https://doi.org/10.3382/ps/peu001>
- Sakaridis, I., Soutos, N., Dovas, C., Papavergou, E., Ambrosiadis, I. & Koidis, P. (2012). Lactic acid bacteria from chicken carcasses with inhibitory activity against *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. *Anaerobe*, Volume 18, Issue 1, Páginas 62-66, Acedido em Setembro 23, 2018, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.09.009>.
- Schillinger, U. , Kaya, M. and Lücke, F. (1991), Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 473-478. Acedido em 22 de setembro de 2018, disponível em <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02743.x>
- Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(2), 169-183. Acedido em Setembro 10, 2017, disponível em <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/4/2/169>
- Seeliger, H. P. R. (1981). Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). *Zentralbl Bakteriell Hyg 1 Abt Orig A* 249, 487–493. Acedido em Fevereiro 10, 2017, disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0174303181801084>
- Seeliger, H. P. R., Rocourt, J., Schrettenbrunner, A., Grimont, P. A. D. & Jones, D. (1984). *Listeria ivanovii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 336–337. Acedido em Fevereiro 10, 2017, disponível em <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/34/3/ijsem-34-3-336.pdf?expires=1538004222&id=id&accname=guest&checksum=152DB777DB91603CF72D446F42A52075>
- Simon, M.; Gray, D. & Cook, N. (1996). DNA Extration and PCR Methods for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Cold – Smoked Salmon. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 62, Nº 3: 822-824. Acedido em Fevereiro 15, 2018, disponível em <https://aem.asm.org/content/62/3/822>
- Talon, R., Lebert I., Lebert A., Leroy S., Garriga M., Aymerich T., Drosinos E., Zannardi E., Lanieri A., Fraqueza M.J., Patarata L. & Laukova A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*. 77: 570–579. Acedido em Abril 1, 2018, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22061943>
- Uyttendaele, M., Busschaert, P., Valero, A., Geeraerd, A., Vermeulen, A., Jaxsens, L., Goh, K., De Loy, A., Van Impe, J., Devlieghere, F. (2009). Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 133, Issues 1–2, Páginas 94-104. Acedido em Setembro 22, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.002>.

- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Vandekinderen, I., Debevere, J. (2006). The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiology*, Volume 23, Issue 6, Páginas 511-518. Acedido em Setembro 23, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.10.005>.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M., & den Bakker, H. C. (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(1), 286–292. Acedido em Abril, 24, 2018, disponível em <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.070839-0>
- World Health Organization & Food and Agriculture Organization (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Microbiological Risk Assessment Series*, 5. Acedido em Fevereiro, 5, 2018, disponível em <http://www.fao.org/3/a-y5394e.pdf>
- World Health Organization (2004). *WHO Regional Publications European Series*, No.96. Acedido a 6 Maio de 2017, disponível em http://www.who.int/nutrition/publications/Food_and_health_Europe%20newbasis_for_%20action.pdf
- World Health Organization (2015). *Estimates of burden of foodborne disease –European perspective*. Acedido a 6 Maio de 2017, disponível em http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg/en/

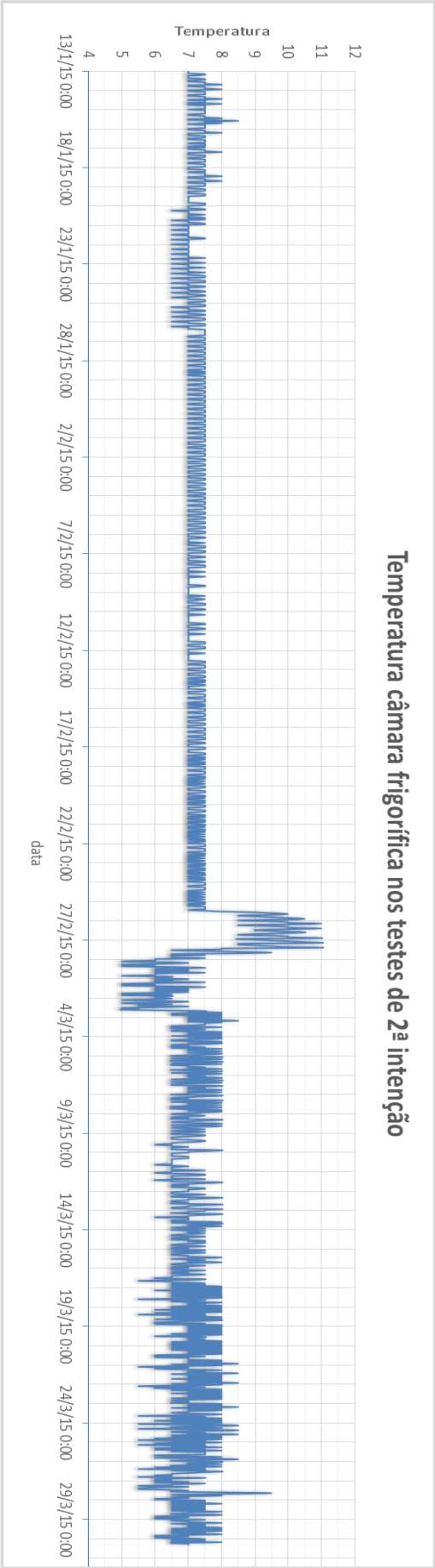
Parte V: Anexos

Anexo 1 – Árvore de decisão para decisão sobre estudos de vida útil.

Adaptado de CE/DG SANCO, 2008.



Anexo 2 – Temperatura de armazenamento dos produtos nos testes de desafio



Anexo 3 – Poster publicado

ICOMST (International Congress of Meat Science and Technology, France, 2015). Aceite para apresentação de um poster.

Listeria monocytogenes challenge testing in cooked and cooked-smoked poultry ready-to-eat products

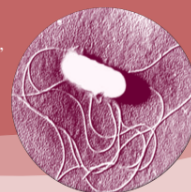
M. Traça¹, L. Ferreira¹, O. Cirilo¹ and M.J. Fraqueza¹

¹ Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA), Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Av. da Universidade Técnica, Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisbon, Portugal



U LISBOA

UNIVERSIDADE DE LISBOA



INTRODUCTION

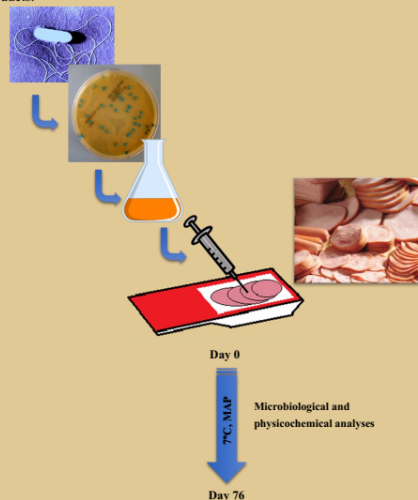
Listeria monocytogenes is frequently present in soil, vegetation, feces of animals, fresh meat, raw milk and fish and it may cause, when ingested in sufficient quantity, a severe illness in humans called listeriosis, which can often be fatal. The importance of this foodborne pathogen results from its capacity to grow or survive in a chilled environment, which makes *L. monocytogenes* a significant hazard in ready-to-eat (RTE) products. The purpose of this study was to assess how *Listeria monocytogenes* behaves in sliced RTE poultry cooked and cooked-smoked products under modified atmosphere package (MAP) during storage.

MATERIALS AND METHODS

Ready-to-eat poultry products: The tested products were cooked-smoked turkey sausage (TS) and turkey ham (TH). These products were sliced under industrial conditions and packed in modified atmosphere (20-30% CO₂ and 70-80% N₂).

Isolation of *Listeria* and preparation of inoculum: The isolates used were constituted by one reference strain (*Listeria monocytogenes* ATCC U937) and two isolates from samples of a poultry industry (one from raw material and another from a RTE product), prepared by mixing equal volumes of the three strains with an optical density (OD_{625nm}) of 0.5-0.7 in order to obtain 100-500 cfu/g in the RTE products.

Challenge tests: The protocol used was adapted from the guidelines in the technical guidance on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in RTE products.



Statistical analysis: Data were analyzed using Excel 2013 and SAS System 9.4 software.

CONCLUSION

While *L. monocytogenes* was able to grow in RTE poultry cooked products, it was not in cooked-smoked poultry products. It was not detected any 2-log₁₀ increase during shelf-life of cooked poultry products. The studied products revealed *L. monocytogenes* inhibitory and limiting factors such as aw, pH and microbial competition due to lactic acid bacteria that could explain the control of the pathogen growth in these challenge tests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the participating industry and to technical support provided by Prof. L. Telo da Gama, Maria José Fernandes and Maria Helena Fernandes. Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health (CIISA) is gratefully acknowledged for logistic support.

RESULTS

Physicochemical characterization:

Table 1- Physicochemical characteristics with regression equations and coefficient of determination.

Product	Day	pH	aw
TS	9	6.27 ± 0.10	0.892 ± 0.01
	38	5.86 ± 0.12	0.838 ± 0.03
	72	5.79 ± 0.08	0.799 ± 0.00
$y = 0.0002x^2 - 0.0233x + 6.4659$ $R^2 = 0.8179$			
TH	9	5.91 ± 0.29	0.826 ± 0.03
	38	5.41 ± 0.08	0.797 ± 0.00
	72	5.37 ± 0.07	0.800 ± 0.00
$y = -0.0084x + 5.8946$ $R^2 = 0.5036$			

Table 2- MAP gases percentage with regressions equations and coefficient of determination.

Product	Day	O ₂ (%)	CO ₂ (%)
TS	9	0.20 ± 0.08	25.40 ± 1.55
	38	0.30 ± 0.24	24.07 ± 1.77
	72	0.73 ± 0.29	23.40 ± 1.65
$y = 0.0086x + 0.0705$ $R^2 = 0.4737$			
TH	9	0.20 ± 0.08	26.23 ± 1.59
	38	0.17 ± 0.17	26.03 ± 0.90
	72	0.60 ± 0.29	24.47 ± 0.63
$y = 0.0065x + 0.0631$ $R^2 = 0.3557$			

Legend: Cooked-smoked turkey sausage (TS); Turkey ham (TH).

The physicochemical characteristics (pH and aw) of the studied products are presented in table 1. With such aw and pH results, these products were considered as unable to allow growth of *L. monocytogenes*, according to microbiological criteria. Aw results were below the growth limit for both products. Despite that, one of these products was able to support growth of *L. monocytogenes*.

The results on modified atmosphere gases are presented in Table 2. The inhibitory gas CO₂ remained constant during all products' shelf-life and under previously defined concentrations (70-80% N₂ + 20-30% CO₂). Using modified atmosphere package could have an inhibitory effect on *L. monocytogenes*, however it is always important to remember that this pathogen is a facultative anaerobe, so it can be a potential hazard for this type of products.

Microbiological characterization:

Figure 1. Microbiological characteristics of cooked-smoked turkey sausage (TS).

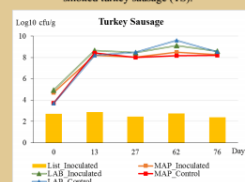
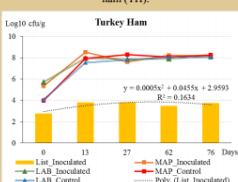


Figure 2. Microbiological characteristics of turkey ham (TH).



L. monocytogenes growth potential (δ) in the studied products was: -0.33 log₁₀ cfu/g for cooked-smoked turkey sausage and 0.99 log₁₀ cfu/g for turkey ham. This means that the cooked-smoked product (turkey sausage, TS) was not able to support *L. monocytogenes* growth, while in turn the cooked product (turkey ham, TH) was. In order to respect the limit of 100 cfu/g (2 log₁₀, according to microbiological criteria) at shelf-life's end, the maximum initial concentration for TH is 1.01 log₁₀ cfu/g (=10 cfu/g). No 2-log₁₀ increase (from 1 to 100 bacteria) was detected during TH shelf-life.

L. monocytogenes maximum growth rate results are presented in Table 3.

Table 3- Maximum growth rate (log₁₀ cfu/day).

Legend: Cooked-smoked turkey sausage (TS); Turkey ham (TH).

Product	<i>Listeria monocytogenes</i> (log ₁₀ cfu/day)
	Δy ₀₋₁₃ / Δt ₀₋₁₃ Δy ₁₃₋₂₇ / Δt ₁₃₋₂₇ Δy ₂₇₋₆₂ / Δt ₂₇₋₆₂ Δy ₆₂₋₇₆ / Δt ₆₂₋₇₆
TS	0.01 -0.03 0.01 -0.03
TH	0.08 0.00 -0.01 0.02

Mesophilic aerobic total (MAP) and lactic acid bacteria (LAB) counts presented by both products under study were high. It seems that lactic acid bacteria were dominant and this could be one of the reasons why *L. monocytogenes* growth was under control in this challenge test, however it was not possible to demonstrate any correlation between *L. monocytogenes* and lactic acid bacteria count.